

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaftlichen Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

# **Die Rolle humaner NK-Zellen für die Eradikation von Leukämien in der HLA-haploidentischen Knochenmark- und Stammzelltransplantation**



**Dominik ter Meer**

aus München

Mai 2007

Erstgutachter:

Frau PD Dr. Christine S. Falk

Zweitgutachter:

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Dissertation eingereicht am:

23.05.2007

Tag der mündlichen Prüfung:

06.12.2007

***Meinen Eltern gewidmet***

# INHALTSVERZEICHNIS

## A. ZUSAMMENFASSUNG

## **B. EINLEITUNG** **1**

---

### **1. Natürliche Killerzellen und ihre Regulation** **1**

#### **1.1 Bedeutung der Natürlichen Killerzellen** **2**

#### 1.2 Effektorfunktionen der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) 3

##### 1.2.1 Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen 3

##### 1.2.2 Sekretorische Aktivität der Natürlichen Killerzellen 5

#### **1.3 Überblick über die Rezeptoren der Natürlichen Killerzellen** **5**

##### 1.3.1 Liste der NK-Zellrezeptoren 5

###### 1.3.1.1 Inhibierende NK-Zellrezeptoren 6

###### 1.3.1.2 Aktivierende NK-Zellrezeptoren 7

##### 1.3.2 Familie der Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (KIR) 8

###### 1.3.2.1 Inhibierende KIR-Rezeptoren (iKIR) 8

###### 1.3.2.2 Liganden der inhibierenden KIRs 8

###### 1.3.2.3 Aktivierende KIR-Rezeptoren (aKIR) 9

###### 1.3.2.4 Liganden der aktivierenden KIR-Rezeptoren 10

###### 1.3.2.5 KIR-Haplotypen 10

##### 1.3.3 C-Typ-Lektin-Rezeptoren 11

###### 1.3.3.1 Das inhibitorische Heterodimer CD94/NKG2A 11

###### 1.3.3.2 Der aktivierende Heterodimerkomplex CD94/NKG2C 12

###### 1.3.3.3 Der aktivierende Rezeptor NKG2D 12

##### 1.3.4 Aktivierende Rezeptoren der Ig-Superfamilie 13

###### 1.3.4.1 Natürliche-Zytotoxizitäts-Rezeptoren 13

###### 1.3.4.2 Aktivierende Rezeptoren der CD2-Familie, 2B4 (CD244) 14

##### 1.3.5 Inhibitorische Rezeptoren der Ig-ähnlichen Transkript-Familie (ILT, LIR) 15

#### **1.4 Zusammenspiel der IR und AR und Selbst-Toleranz** **15**

#### **1.5 NK-Zell-Subpopulationen** **17**

#### **1.6 NK-Zellentwicklung** **18**

### **2. NK-Zellen und ihre klinische Bedeutung** **19**

#### **2.1 Behandlung von Leukämien** **20**

##### 2.1.2 Komplikationen bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) 21

###### 2.1.2.1 Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) 21

###### 2.1.2.2 Infektionen nach HSZT 22

<b>2.2 Haploidentische Transplantation und NK-Zell-Autoreaktivität</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Haploidentische Transplantation nach dem Protokoll von Prof. Dr. Kolb</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1 T-Zell-Depletion der PBSC-Präparate durch den CD6-Marker</b>	<b>26</b>
<b>3. Aufgabenstellung</b>	<b>27</b>
<b>C. MATERIAL</b>	<b>28</b>
<b>1. Geräte</b>	<b>28</b>
<b>2. Chemikalien</b>	<b>29</b>
<b>3. Verbrauchsmaterial Molekularbiologie</b>	<b>30</b>
3.1 RNS Isolierung und Reverse Transkription	30
3.2 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	30
3.3 Gelelektrophorese	31
3.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Agarosegel	31
3.5 Klonierung	31
3.6 HLA-C- und KIR-Typisierung	32
<b>4. Verbrauchsmaterial Biochemie</b>	<b>32</b>
4.1 Multiplex Protein-Analysen	32
4.1.1 Bioplex-Analyse	32
4.1.2 Phosphoprotein-Analyse	32
4.1.3 Westernblotanalyse	33
4.1.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	34
<b>5. Verbrauchsmaterial Zellkultur</b>	<b>34</b>
5.1 Medien	35
<b>6. Verbrauchsmaterial Allgemein</b>	<b>35</b>
<b>7. Zellen</b>	<b>36</b>
7.1 Zelllinien	36
7.2 Spender und Patienten Blut	37
<b>8. Spender- und Patienten-DNS</b>	<b>38</b>
<b>9. Antikörper</b>	<b>39</b>
9.1 Primärantikörper	39
9.2 Sekundärantikörper	40
<b>10. Personen- und Firmenverzeichnis</b>	<b>41</b>

<b>D. METHODEN</b>	<b>43</b>
<b>1. Allgemeine Methoden</b>	<b>43</b>
1.1 Multiplex-Verfahren zur Quantifizierung von Proteinen und Nukleinsäuren, Prinzip des Multiplex-Systems	43
<b>2. Methoden der Zellkultur</b>	<b>44</b>
2.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultivierung	44
2.2 Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	44
2.3 Bestimmung der Zellzahl	45
2.4 Einfrieren von Zellen	45
2.4.1 Allgemeines Verfahren	45
2.4.2 Verfahren für PBSC-, CD6-depletierte- und NTCB-Präparate	46
2.5 Auftauen von Zellen	46
2.5.1 Allgemeines Verfahren	46
2.5.2 Verfahren für PBSC-, CD6-depletierte- und NTCB-Präparate	46
2.6 Kultivierung adhärenter Zellen	47
2.7 Kultivierung nicht-adhärenter Zellen	47
2.8 Kultivierung PBMC Zellen	47
2.9 Separation verschiedener Zellpopulationen	48
2.9.1 Negative Isolation von NK Zellen	48
2.9.2 CD6-Depletion von NK Zellen	48
2.9.2.1 Negative Isolation mit magnetischen Mikrosphären	48
2.9.2.2 CD6-Depletion nach Miltenyi	49
<b>3. Methoden der Molekularbiologie</b>	<b>49</b>
3.1 Isolierung von RNS	49
3.2 Reverse Transkription	50
3.3 Isolierung genomischer DNS	50
3.4 PCR	50
3.5 Gelelektrophorese	51
3.6 Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Agarosegel	52
3.7 Klonierung von Nukleinsäuren in Vektoren	52
3.7.1 Klonierung von ULBP4-syn	52
3.7.1.1 ULBP4-syn	52
3.7.1.2 Transformation	53
3.7.1.3 Selektion positiver Klone	53
3.7.1.4 Kolonie-PCR	54
3.7.1.5 Minipräparation	54
3.7.2 Klonierung in den pcDNA3.1(+) Vektor	55
3.7.2.1 Vektorkarte pcDNA3.1(+/-)	55
3.7.2.2 Vektorkarte pPCR-Script	55

3.7.2.3 <i>XhoI</i> und <i>BamHI</i> -Verdau	56
3.7.2.4 Ligation	56
3.7.3 Sicherheitsbestimmungen	57
3.8 HLA-C Typisierung mittels LABType™ SSO	57
3.9 KIR SSO Genotypisierung	59
3.10 Auswertung der Typisierungsdaten	59
<b>4. Methoden der Biochemie</b>	<b>61</b>
4.1 Bioplex-Verfahren	61
4.2 Phosphoprotein-Bestimmung	62
4.3 Westernblot	64
<b>5. Durchflußzytometrie</b>	<b>65</b>
5.1 Allgemein	65
5.2 Direkte Färbungen	65
5.3 Indirekte Färbungen	66
5.4 Antikörpertest	66
5.5 Auswertung der FACS-Daten	66
<b>6. Ermittlung der Zytotoxizität im <sup>51</sup>Chromfreisetzungstest</b>	<b>67</b>
6.1 Behandlung der Zielzellen	67
6.2 Direkte zellvermittelte Lyse	67
6.3 Redirigierte Lyse	67
6.4 Messung und Auswertung	68
<b>7. CFSE-Proliferations-Test</b>	<b>68</b>
7.1 CFSE	68
7.2 Anfärbung mit CFSE	69
7.3 Proliferationstest	69
<b>8. CD107a-Degranulations-Assay</b>	<b>69</b>
<b>9. Toleranzexperiment</b>	<b>70</b>
<b>10. <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau</b>	<b>71</b>
<b>11. Statistik</b>	<b>71</b>

<b>E. ERGEBNISSE</b>	<b>72</b>
<b>1. Charakterisierung der individuellen funktionellen Unterschiede verschiedener NK-Linien</b>	<b>72</b>
1.1 Der aktivierende Rezeptor NKG2D und sein Ligand ULBP4	72
1.1.1 Klonierung von ULBP4 und Erzeugung stabiler K-562-Transfektanten mit ULBP4 Expression	73
1.1.2 Erzeugung eines monoklonalen Antikörpers gegen ULBP4	74
1.1.3 Untersuchung des Effekts der ULBP4-Transfektanten auf die Funktion verschiedener NK-Zelllinien	77
1.1.3.1 Phänotyp verschiedener NK-Zelllinien	77
1.1.3.2 Zytotoxizität verschiedener NK-Zelllinien gegenüber K-562-ULBP4-Transfektanten	80
1.1.3.3 Einfluss der NKG2D-Liganden ULBP1,2,3 und MICA auf die Zytotoxizität der Zelllinie NKL gegenüber K-562 und der K-562-ULBP4-Transfektante	81
1.2 Sezernierung von Zytokinen nach Stimulation aktivierender Rezeptoren auf NK-Zelllinien	83
1.3 Signaltransduktion in NK-Zellen nach Stimulation mit PMA-Ionomycin und Vergleich mit einer T-Zelllinie	89
1.3.1 Stimulation der charakterisierten NK-Zelllinien mit PMA-Ionomycin und Auswirkung auf die Phosphorylierung wichtiger Kinasen	91
1.4 Expressionsmuster von CD6 und Depletion des CD6 <sup>+</sup> -NK-Zell-Kompartiments aus PBL eines Normalspenders	95
<b>2. Relevanz der Natürlichen Killerzellen bei der haploidentischen Knochenmark- und Stammzelltransplantation</b>	<b>98</b>
2.1 Depletion von T-Zellen und einer Gruppe von NK-Zellen, Anreicherung hämatopoetischer Vorläuferzellen (CD34 <sup>+</sup> ) durch Depletion mittels monoklonaler anti-CD6-Antikörper	98
2.2 CD6 als differentieller Marker auf NK-Zellen	101
2.3 Modulation des NK-Zellrepertoires aufgrund der CD6-Depletion	104
2.4 Veränderung der Funktion des im Transplantat verbleibenden NK-Repertoires im Vergleich zu NK-Zellen aus PBSC	106
2.4.1 Isolierung von NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletierten PBSC	106
2.4.2 Zytotoxizität und Degranulation von NK-Zellen in PBSC und CD6-depletierten PBSC	108
2.4.3 Proliferation von NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletiertem PBSC nach Stimulation	112
2.4.4 Freisetzung von Zytokinen bzw. Chemokinen aus Zellen der PBSC- und CD6-depletierten PBSC-Fraktion nach Stimulation mit Zielzellen	116
2.5 Einfluss des HLA-C- und KIR-Genotyps auf den klinischen Verlauf nach Transplantation	119
2.5.1 HLA-C- und KIR-Typisierung der Spender-Patienten-Kombinationen	119
2.5.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs	122



2.5.3 Einfluss der HLA-C-Gruppen auf das Überleben der Patienten	124
2.5.4 Einfluss der KIR-Haplotypen des Spenders auf das Überleben der Patienten	129
2.5.5 Einfluss der Anzahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren des Spenders auf das Überleben der Patienten	130
2.5.6 Kombination der HLA-C-Allele des Patienten mit den KIR-Genen des Spenders	132
2.5.7 Einfluss der HLA-C-Gruppen und Anzahl der aktivierenden KIR-Gene auf die akute GvHD der Patienten	134
<b>3. Rekonstitution der peripheren NK-Zellen in den Patienten nach Transplantation</b>	<b>136</b>
<b>4. Toleranzmodell der haploidentischen Transplantation</b>	<b>142</b>
<b>F. DISKUSSION</b>	<b>147</b>
<b>1. Charakterisierung der individuellen funktionellen Unterschiede verschiedener NK-Linien</b>	<b>147</b>
1.1 Der aktivierende Rezeptor NKG2D und sein Ligand ULBP4	148
1.1.1 Klonierung von ULBP4 und Erzeugung stabiler K-562-Transfektanten mit ULBP4-Expression	149
1.1.2 Erzeugung eines monoklonalen Antikörpers gegen ULBP4	149
1.1.3 Untersuchung des Effekts der ULBP4-Transfektanten auf die Funktion verschiedener NK-Zelllinien	150
1.1.3.1 Phänotyp verschiedener NK-Zelllinien	150
1.1.3.2 Zytotoxizität verschiedener NK-Zelllinien gegenüber K-562-ULBP4-Transfektanten	151
1.2 Sezernierung von Zytokinen nach Stimulation aktivierender Rezeptoren auf NK-Zelllinien	153
1.3 Signaltransduktion in NK-Zellen nach Stimulation mit PMA-Ionomycin und Vergleich mit einer T-Zelllinie	155
1.4 Expressionsmuster von CD6 auf Natürlichen Killerzellen	159
<b>2. Relevanz der Natürlichen Killerzellen bei der haploidentischen Knochenmark- und Stammzelltransplantation</b>	<b>161</b>
2.1 Depletion von T-Zellen und einer Gruppe von NK-Zellen, Anreicherung hämatopoetischer Vorläuferzellen (CD34 <sup>+</sup> ) durch Depletion mittels monoklonaler anti-CD6-Antikörper	162
2.2 Modulation des NK-Zellrepertoires aufgrund der CD6-Depletion	163
2.3 Veränderung der Funktion des im Transplantat verbleibenden NK-Repertoires im Vergleich zu NK-Zellen aus PBSC	164
2.3.1 Isolierung von NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletierten PBSC	164
2.3.2 Zytotoxizität und Degranulation von NK-Zellen in PBSC und CD6-depletierten PBSC	165

## INHALTSVERZEICHNIS

---

2.3.3 Proliferation von NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletiertem PBSC nach Stimulation	167
2.3.4 Freisetzung von Zytokinen bzw. Chemokinen aus Zellen der PBSC- und CD6-depletierten PBSC-Fraktion nach Stimulation mit Zielzellen	168
2.4 Einfluss der HLA-C-Gruppen auf das Überleben der Patienten	169
2.5 Einfluss der KIR-Haplotypen des Spenders auf das Überleben der Patienten	171
2.6. Einfluss der Anzahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren des Spenders auf das Überleben der Patienten	172
2.7 Kombination der HLA-C-Allele des Patienten mit den KIR-Genen des Spenders	173
2.8 Einfluss der HLA-C-Gruppen und Anzahl der aktivierenden KIR auf die akute GvHD der Patienten	174
 <b>3. Rekonstitution der peripheren NK-Zellen in den Patienten nach Transplantation</b>	 <b>174</b>
 <b>4. Toleranzmodell der haploidentischen Transplantation</b>	 <b>176</b>
 <b><u>G. LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	 <b><u>180</u></b>
 <b><u>H. DANKSAGUNG</u></b>	 <b><u>198</u></b>
 <b><u>I. ANHANG</u></b>	 <b><u>199</u></b>

## ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod ( <i>activation induced cell death</i> )
AIT	Adoptive Immuntherapie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
AR	aktivierender Rezeptor
ATF-2	Aktivierter Transkriptions-Faktor-2
ATG	Antithymozytenglobulin
B-LCL	lymphoblastoide (EBV-transformierte) B-Zelllinie
bp	Basenpaare
BZR	B-Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	ungefähr
CD	Differenzierungsantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNS	zur mRNA komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNS
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetat- <i>N</i> -succinimidylester
CLL	chronisch-lymphatische Leukämie
CpM	Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CML	Chromfreisetzungstest ( <i>cell mediated lympholysis</i> )
<sup>51</sup> Cr	radioaktives Chromisotop
CsA	Cyclosporin A
CY	Cyclophosphamid
DBC	Spender-Leukozytenverabreichung ( <i>donor buffy coat</i> )
DC	Dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
dNTP	Didesoxy-Nukleotid-Triphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Di-Natriummethylenediamintetraacetat
EFS	Überlebensrate ohne Komplikationen ( <i>event free survival</i> )
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase ( <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )
E:T	Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis ( <i>effector cell to target cell ratio</i> )
FACS	fluoreszenzaktiviertes Zellsortiergerät (Durchflußzytometer)
FBS	fötales Rinderserum
FSC	Vorwärts-Streulicht ( <i>forward scatter</i> )
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierungsfaktor ( <i>granulocyte colony stimulating factor</i> )
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GvHD	Graft-versus-Host-Erkrankung

## ABKÜRZUNGEN

---

GvL	Graft-versus-Leukämie-Effekt
HBSS	Hanks balanced salt solution
HLA	humane Leukozytenantigene
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HvG	Host-versus-Graft-Erkrankung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT	Ig-ähnliche Transkripte
IR	Inhibierender Rezeptor
IS	immunologische Synapse
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes aktivierendes Motiv ( <i>immunoreceptor tyrosin-based activating motif</i> )
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes inhibierendes Motiv ( <i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i> )
ITSM	Immun-Tyrosin-basiertes Schaltermotiv
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren
LAMP-1	lysosomales Membranglykoprotein-1,
LFA-1	Leukozytenfunktion-assoziiertes Molekül
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex ( <i>leucocyte receptor complex</i> )
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
mAk	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MTX	Methotrexat
NAHR	nicht-allelelische homologe Rekombination
NCR	Natürlicher-Zytotoxizitätsrezeptor ( <i>natural cytotoxicity receptor</i> )
NK	Natürliche Killerzelle
NKC	Natürliche-Killerzell-Komplex ( <i>natural killer cell complex</i> )
NTB-A	NK-, B-, T-Zellantigen ( <i>NK, T-, B-cell antigen</i> )
NTCB	CD6-positive Fraktion ( <i>non target cell bag</i> )
mRNS	Boten-RNS ( <i>messenger-RNS</i> )
OD	optische Dichte
PBL	Lymphozyten des peripheren Blutes
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PBSC	Periphere Blutstammzellen ( <i>peripheral blood stem cells</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHA	Phytohämagglutinin (Lektin)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
POX	Peroxidase
RPMI	Medium ( <i>Rosewell Park Memorial Institut</i> )
RNS	Ribonukleinsäure
SSC	Seitwärts-Streulicht ( <i>side scatter</i> )
Strep	Streptavidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TBI	Ganzkörperbestrahlung ( <i>total body irradiation</i> )

## ABKÜRZUNGEN

---

TBS	Tris-gepufferte Saline
TCGF	T-Zell-Wachstumsfaktor ( <i>T cell growth factor</i> )
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
u.a.	unter anderem
U	Einheit der Enzymaktivität ( <i>unit</i> )
UCB	Nabelschnurblut ( <i>umbilical cord blood</i> )
ULBP	UL16-binding protein
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
XLP	X-verknüpftes lymphoproliferatives Syndrom
z. B.	zum Beispiel

### ZUSAMMENFASSUNG

Die durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermittelte angeborene Immunität stellt einen Grundpfeiler der Abwehr gegen Pathogene bzw. der Eradikation entarteter Zellen im Menschen dar. Zusammen mit der durch T-Lymphozyten und B-Lymphozyten vermittelten adaptiven Immunabwehr versetzt das angeborene Immunsystem den Organismus in die Lage, wirksam und schnell gegen eigene entartete Zellen bzw. pathogene Organismen vorzugehen. NK-Zellen unterscheiden sich nicht nur in ihrem Phänotyp von T- und B-Lymphozyten, sondern vor allem durch eine nicht-Antigenabhängige Erkennung und Aktivierung über eine Vielzahl aktivierender NK-Rezeptoren. Gleichzeitig wird durch die Expression verschiedener inhibierender Rezeptoren sichergestellt, dass NK-Zellen normalerweise eine Art Selbst-Toleranz gegenüber gesunden Zellen des Organismus besitzen. Der Aktivität der Natürlichen Killerzellen liegt demgemäß ein fein ausbalanciertes dynamisches Gleichgewicht der über inhibierende bzw. aktivierende Rezeptoren vermittelten Signale zugrunde. Zu den wichtigsten Rezeptoren auf NK-Zellen gehören die Killerzell-Immunoglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (KIR). Bei den Liganden der KIR-Rezeptoren handelt es sich um HLA-Klasse-I-Moleküle, wobei von diesen die HLA-C-Moleküle die wichtigste Rolle als Liganden spielen. Die aktivierenden NK-Rezeptoren umfassen neben den Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCRs) das aktivierende Rezeptorhomodimer NKG2D.

Die Regulation der NK-Zellen durch aktivierende Rezeptoren habe ich am Beispiel der Wechselwirkung zwischen NKG2D und seines Liganden ULBP4 untersucht. So konnte ich zeigen, dass die Expression von ULBP4 auf transfizierten K-562-Zellen zu einer gesteigerten Lyse dieser Zellen durch die NK-Linie NKL führt. Darüber hinaus konnte ich nachweisen, dass ULBP4 die Blockierung anderer NKG2D-Liganden auf Zielzellen kompensieren kann. Weiter konnte ich die große Plastizität der NK-Zellen bezüglich ihres Phänotyps und ihrer Funktion an verschiedenen NK-Zelllinien über die Zytokin- bzw. Chemokinsekzernierung nach Stimulus aktivierender Rezeptoren belegen. Dabei konnte ich Unterschiede in der sekretorischen Aktivität der verschiedenen Zelllinien nach Stimulation über NKG2D, die aktivierenden NCRs und eines Rezeptors der CD2-Familie definieren. Diese Unterschiede spiegeln sich in den Untersuchungen der Phosphorylierung von Signalkinasen wider. Dabei wurde die Signaltransduktion in NK-Zellen durch Nachweis phosphorylierter Signalkinasen mittels Western-Blot und dem neuartigen Multiplex-Verfahren verfolgt. Hierbei zeigten sich interessante Unterschiede in der Stärke der Phosphorylierung verschiedener Signalkinasen in den NK-Linien NKL, YT, NK92, der allogenen NK-Linie B.3NK und der T-Zelllinie Jurkat. Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten Unterschiede der NK-Funktionen durch den

individuellen Phosphorylierungszustand der an der Signaltransduktion beteiligten Signalkinasen in den einzelnen NK-Linien bedingt sind.

Aufgrund der Expressionsdichte des CD56-Moleküls (NCAM) auf NK-Zellen unterscheidet man zwei NK-Populationen. Die durch eine geringe CD56-Expression gekennzeichneten CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen vermitteln nach heutigem Verständnis die klassische NK-Zytotoxizität. Die durch eine hohe CD56-Expression gekennzeichneten CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen sezernieren dagegen nach Stimulation hauptsächlich Zytokine und treten über diese mit dem adaptiven Immunsystem in Wechselwirkung. Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte ich CD6 als weiteren differentiellen Marker für NK-Subpopulationen charakterisieren, wobei CD6 hauptsächlich auf CD16-positiven CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimiert wird. Daneben konnte ich durch Untersuchungen der Funktion und des Phänotyps der NK-Zellen aus den mobilisierten Stammzellpräparaten von Spendern der HSZT die Bedeutung von CD6 als Depletionsmarker belegen. Ich konnte nachweisen, dass durch die CD6-Depletion die CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen statistisch signifikant depletiert werden, wobei es gleichzeitig zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Anzahl KIR-positiver NK-Zellen kommt. Diese Verschiebung der NK-Zellpopulation war mit Veränderungen der Zytokinfreisetzung der Zellen in den Spenderpräparaten und der Degranulation und Proliferation der darin enthaltenen NK-Zellen verbunden. Auffallend war, dass nach Stimulation das Zytokin IL-6 und die Chemokine MIP-1 $\beta$  und IL-8 sezerniert werden. Dabei zeigte sich nach Stimulus eine statistisch signifikante Freisetzung von IL-8 durch die Zellen der CD6-depletierten Stammzellpräparaten der Spender im Vergleich zur unstimulierten Situation. Weiter konnte ich belegen, dass NK-Zellen nach CD6-Depletion potentiell zytotoxisch gegenüber Zielzellen wirken und nach Stimulus proliferieren können.

Die KIR-HLA-Genetik spielt eine herausragende Rolle in der humanen Knochenmark- und Stammzelltransplantation. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ich hochauflösend die KIR-Haplotypen sowie die HLA-C-Allele von 74 Spender-Patienten-Kombinationen bestimmen. Mit Hilfe klinischer Daten konnte ich bei 50 dokumentierten Patienten den Einfluss der HLA-C- und KIR-Genetik statistisch in Bezug auf die Überlebenswahrscheinlichkeit untersuchen. Dabei konnte kein statistisch signifikanter Einfluss im Sinne der „KIR-Ligand-Mismatch-Situation“ belegt werden. Während weder die HLA-C-Konstellation des Patienten, noch die KIR-Konstellation des Spenders alleine einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten hatten, ergab die Kombination beider Genloci überraschende Befunde bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit.

Durch die genannte Kombination aus KIR-Haplotyp der Spender und der HLA-C-Allele der Patienten konnte ich im Fall von AML-Leukämien eine spezifische Kombination aus Spendern mit KIR-Haplotyp A/B oder B/B und Patienten mit homozygoten HLA-C-Gruppe 1

Allelen als statistisch signifikanten Überlebensvorteil belegen. Bei ALL-Patienten zeigte sich hingegen ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit HLA-C C1/C2-Allelen und Spendern mit KIR-Haplotyp A/A. Dies könnte sich als prognostisches Mittel für die Auswahl einer geeigneten Spender-Patienten-Kombination bei der haploidentischen Stammzell- und Knochenmarktransplantation erweisen. Darüber hinaus habe ich den Einfluss der HLA-C-Ausstattung des Patienten und der KIR-Gene des Spenders in Bezug auf die Graft-versus-Host-Erkrankung nach haploidentischer Transplantation untersucht. Dabei konnte ich keinen statistisch signifikanten Einfluss der genannten Merkmale belegen.

Bei der Untersuchung der Rekonstitution von peripheren NK-Zellen in vier Patienten konnte ich eine Erholung der CD6-positiven NK-Population beobachten und Hinweise dafür finden, dass Rekonstitution KIR-positiver NK-Zellen und NK-Zellen mit CD94/NKG2A-Expression spiegelbildlich verläuft.

Die vorliegende Arbeit erweitert den Wissenstand über die NK-Biologie und kann als Grundlage für die weitere Erforschung der Wirkung von NK-Zellen bei der Behandlung entarteter Zellen dienen.



### B. EINLEITUNG

#### 1. Natürliche Killerzellen und ihre Regulation

Das Immunsystem des Menschen besteht aus vielen Komponenten, z.B. mechanischen Barrieren für Erreger, Abwehrzellen (Leukozyten, weiße Blutzellen) sowie chemischen Botenstoffen. Es lässt sich in Bezug auf die Leukozyten in zwei voneinander unterscheidbare Systeme einteilen, die sich gegenseitig beeinflussen und in ständiger Wechselwirkung miteinander stehen.

Das so genannte „angeborene“ Immunsystem umfasst Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC), Granulozyten sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und entfaltet seine Wirkung unmittelbar nach dem Initialkontakt mit einem Erreger direkt an dessen Eintrittsstelle in den Organismus (zumeist in der Peripherie). Dem gegenüber steht das „erworbene“ adaptive Immunsystem, das T- und B- Lymphozyten einschließt und zeitlich sowie räumlich getrennt vom angeborenen Immunsystem Erreger bekämpft. Die T- und B-Lymphozyten sind durch, für jede Zelle individuelle Isoformen der T- bzw. B-Zellrezeptoren gekennzeichnet, die damit jeweils ein spezifisches Antigen erkennen können (Janeway and Travers 2004).

NK-Zellen unterscheiden sich von T- und B- Lymphozyten primär dadurch, dass sie unter Kontrolle einer begrenzten Anzahl von Keimbahn-kodierten, also vererbten, Rezeptoren stehen, die im Gegensatz zu den Rezeptoren der T- und B-Zellen nicht einer somatischen Rekombination, also einer Genumlagerung der V(D)J-Gensegmente, unterliegen. NK-Zellen weisen somit weder T-Zell- noch B-Zell-Rezeptoren (TZR/BZR) für die Erkennung eines Antigens auf, sondern werden über eine Vielzahl aktivierender (AR) bzw. inhibierender Rezeptoren (IR) reguliert. Der Aktivierungszustand einer NK-Zelle wird dabei durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Inhibition über die Signale der AR und IR bestimmt (Moretta, Bottino et al. 1996; Lanier 1998; Long 1999; Ravetch and Lanier 2000; Moretta, Biassoni et al. 2002).

NK-Zellen sind große granuläre Zellen und stellen mit 10 – 15% die drittgrößte Klasse der im Blut zirkulierenden Lymphozyten dar. Sie lassen sich jedoch auch in Lymphknoten, der Leber, Bauchhöhle und Plazenta lokalisieren. NK-Zellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur schnellen zytotoxischen Aktivität gegenüber von Erregern befallenen oder entarteten Zellen für die Funktion des Immunsystems des Organismus besonders wichtig (Trinchieri 1989). Gegenüber normalen gesunden Zellen weisen NK-Zellen eine Art „Toleranz“ auf (Selbst-Toleranz), d.h. sie attackieren gesundes Gewebe in der Regel nicht. Natürliche Killerzellen entstehen im Knochenmark (Rosmaraki, Douagi et al. 2001) aus hämatopoetischen Stamm- sowie Vorläuferzellen (Yokoyama, Kim et al. 2004) (Colucci, Caligiuri et al. 2003). Neueste

## B. EINLEITUNG

---

Forschungen weisen jedoch auch auf eine Entwicklung von NK-Zellen im Thymus (Di Santo and Vosshenrich 2006) sowie in sekundären lymphatischen Organen, wie z.B. den Lymphknoten hin (Freud, Yokohama et al. 2006).

### 1.1 Bedeutung der Natürlichen Killerzellen

Ursprünglich wurden NK-Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Abtötung bestimmter Tumorzellen *in vitro* entdeckt (Becker, Kiessling et al. 1978). Das Fehlen von NK-Zellen führte im Mausmodell unter anderem zu einer gesteigerten Tumorgenese (Smyth, Godfrey et al. 2001). Eine eindeutige Beteiligung von NK-Zellen bei der Immunität gegen entartete Zellen konnte auch *in vivo* gezeigt werden, wobei schon früh die herausragende Rolle der humanen Leukozyten-Antigen-Moleküle (HLA) des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) bei der Erkennung entarteter Zellen durch NK-Zellen bewiesen werden konnte (Karre, Ljunggren et al. 1986). Die beim Menschen im Haupthistokompatibilitäts-Komplex auf Chromosom 6 kodierten humanen Leukozyten-Antigen-Moleküle lassen sich in zwei Klassen unterteilen:

HLA-Klasse-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren auf der Zelloberfläche intrazelluläre Antigene in Form von Nonamerpeptiden. Die Nonamerpeptide werden aus endogenen Proteinen zytosolischen, viralen oder tumorassoziierten Ursprungs abgeleitet (Dunlop, Doherty et al. 1977; Rammensee 1995). Die Quartärstruktur der HLA-Klasse-I-Moleküle ergibt sich aus einer schweren  $\alpha$ -Kette (45kDa) mit drei extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion sowie einem zytoplasmatischem Teil. Die schwere Kette ist mittels nicht-kovalenter Bindung mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2m, 12kDa) und dem oben genannten Nonamerpeptid assoziiert (Janeway and Travers 2004).

HLA-Klasse-II-Moleküle, die nur von Immunzellen, wie antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC), Makrophagen und B-Lymphozyten sowie aktivierten T-Lymphozyten exprimiert werden, präsentieren 12 – 14 Aminosäuren umfassende Peptide extrazellulären Ursprungs, z.B. aus Erregern oder Toxinen von Erregern, die zuvor durch Endozytose von den Immunzellen internalisiert werden müssen (Germain 1986). Die Präsentation von langen Peptiden im Kontext von HLA-Klasse-II-Molekülen dient der Erkennung durch  $CD4^+$ -T-Helferzellen, die in ihrer Helferfunktion durch Zytokinfreisetzung (IL-4 und IL-5) die B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion anregen.

NK-Zellen werden in ihrer Regulation nur von den HLA-Klasse-I-Molekülen beeinflusst (Lanier 1998) (Moretta, Biassoni et al. 2000). Sechs HLA-Klasse-I-Moleküle lassen sich beim Menschen weiter in zwei Subklassen unterteilen. Von den exprimierten HLA-Klasse-I-Genen des humanen MHC gehören HLA-A, -B und -C zu den hochpolymorphen, klassischen HLA-

## B. EINLEITUNG

---

Klasse-Ia-Molekülen und HLA-E, -F und -G zu den wenig polymorphen, nicht-klassischen HLA-Klasse-Ib-Molekülen.

HLA-A, -B, -C, -E und -G stellen Liganden für NK-Zellrezeptoren dar, die Funktion von HLA-F ist zur Zeit noch unklar (Parham 2006). HLA-C Moleküle spielen die wichtigste Rolle für die Regulation der Natürlichen Killerzellen da sie als Liganden für einige Rezeptoren der Killer-Ig-Rezeptorfamilie (KIR) fungieren. Auf die HLA-C/KIR-Interaktion wird in Abschnitt 1.3 detailliert eingegangen. HLA-G wird während der Embryonalentwicklung auf Amnionzellen sowie auf Plazentagewebe exprimiert (Ellis, Sargent et al. 1986) (Kovats, Main et al. 1990), und schützt den Fötus während der Schwangerschaft vor dem Immunsystem der Mutter (Houlihan, Biro et al. 1995) (Yelavarthi, Fishback et al. 1991) (Le Bouteiller and Blaschitz 1999). Darüber hinaus ist eine Expression von HLA-G auch auf anderen Geweben, z.B. Keratinozyten (Ulbrecht, Rehberger et al. 1994) zu beobachten, wobei die genaue Funktion im adulten Menschen noch nicht geklärt ist. Es wurde jedoch auch eine Expression von HLA-G auf Melanom-, Nieren-, Kolon, Lungen- und Brustkrebszellen postuliert (Fukushima, Oshika et al. 1998; Paul, Rouas-Freiss et al. 1998; Wagner, Rebmann et al. 2000; Ibrahim, Guerra et al. 2001; Lefebvre, Antoine et al. 2002; Urosevic, Willers et al. 2002), deren Relevanz derzeit kontrovers diskutiert wird.

Nach der von Kärre und Ljunggren 1990 postulierten „*missing self*“ Hypothese können NK-Zellen solche Zielzellen am besten lysieren, die keine HLA-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Funktion von NK-Zellen besteht gemäß dieser Hypothese darin, Zellen mit fehlender HLA-Klasse-I-Expression zu erkennen und zu lysieren (Ljunggren and Karre 1990), jedoch gegenüber Zellen mit HLA-Klasse-I-Expression aufgrund einer Regulation über inhibierende Rezeptoren (IR) tolerant zu sein (Selbst-Toleranz). Die Beobachtung, dass NK-Zellen jedoch *in vitro* auch zur Lyse MHC-Klasse-I exprimierender Zellen in der Lage sind, legte eine zusätzliche Regulation durch aktivierende Rezeptoren (AR) nahe, die entweder nicht von den Signalen der inhibierenden NK-Rezeptoren beeinflusst wird, oder diese überschreiben kann (Nishimura, Stroynowski et al. 1988; Leiden, Karpinski et al. 1989; Pena, Alonso et al. 1990; Litwin, Gumperz et al. 1993).

### 1.2 Effektorfunktionen der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)

#### 1.2.1 Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen

Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen basiert auf den gleichen Mechanismen, die auch bei CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (CTL) beobachtet werden, also der gerichteten Exozytose zytotoxischer Granula, die lytische Proteine, wie beispielsweise Perforin, Granzyme und möglicherweise Fas-Ligand enthalten (Trapani and Smyth 2002; Bossi and Griffiths 2005). Die zytotoxische Aktivität setzt eine Adhäsion der Zielzelle und die Ausbildung einer so genannten

## B. EINLEITUNG

---

immunologischen Synapse (IS) zwischen der NK-Zelle und der Zielzelle (Konjugatbildung) voraus, wodurch eine Mikroumgebung (*micro environment*) geschaffen wird, die für die Freisetzung der zytotoxischen Granula notwendig ist. Falls dabei das Gleichgewicht zwischen inhibierenden und aktivierenden Signalen durch die IRs oder ARs der NK-Zellen auf Seiten der Inhibition liegt, löst sich die IS wieder auf. Bei einem quantitativ oder qualitativ stärker ausgeprägten aktivierenden Signal stabilisiert sich die IS. Dabei bildet das Leukozytenfunktions-assoziierte Molekül (LFA-1) zusammen mit Actin und Talin einen Ring um die im Zentrum der IS konzentrierten stimulatorischen Signalrezeptoren und es kommt zu einer Akkumulation zytotoxischer Granula und gleichzeitig zu einer Relokalisation des Mikrotubuli-Strukturzentrums in Richtung des Zentrums der IS. Zusätzlich werden Signalmoleküle für die weitere Übermittlung von Signalen in den Zellkern in die Nähe der IS rekrutiert (Davis 2002; Vyas, Maniar et al. 2002). Die lytischen Proteine Perforin und die Granzyme werden im Gegensatz zu den T-Zellen von NK-Zellen konstitutiv exprimiert und gespeichert (Trapani 2001). Das in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus Perforinmonomeren gebildete Polyperforin erzeugt Löcher in den Zellmembranen der Zielzellen, wodurch zum einen deren Zellintegrität zerstört wird und gleichzeitig Granzyme in die Zellen eindringen können, welche die Apoptose der Zielzelle einleiten (Krahenbuhl and Tschopp 1991; Shi, Kam et al. 1992; Andrin, Pinkoski et al. 1998). Daneben lösen NK-Zellen die Apoptose von Zielzellen auch über den so genannten Todesrezeptor (*death receptor*) aus (Nagata 1997; Smyth, Takeda et al. 2003), wobei es bei CD95-positiven Zielzellen nach Bindung des Fas-Liganden (CD95L) an CD95 zu einer Kaskade endogener proteolytischer Enzyme in den Zielzellen kommt und diese damit in den programmierten Zelltod (Apoptose) getrieben werden (Vujanovic, Nagashima et al. 1996). Die Degranulation, also Exozytose von sekretorischen Lysosomen, kann durch die Freisetzung von Hexosaminidase oder Granzym B im Zellüberstand von NK-Zellen bestimmt werden oder durch den Nachweis der Expression von CD107a, dem lysosomalen Membranglykoprotein-1 (LAMP-1), das nach der Degranulation auf der Oberfläche zytotoxischer Zellen kurzzeitig erscheint. CD107a findet sich zusammen mit Perforin in sekretorischen Lysosomen und wird bei der Fusion der Granula mit der Zellmembran an die Oberfläche der Zellen transportiert und später wieder internalisiert. Durch Oberflächenfärbung von CD107a kann so die Degranulation zytotoxischer Zellen, wie z.B. zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) und NK-Zellen, innerhalb von Minuten nach Stimulation bestimmt werden (Bryceson, March et al. 2005). Zusätzlich zu dieser Rezeptor-vermittelten zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen, verleiht die Expression von CD16 ( $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ ), dem Rezeptor mit niedriger Affinität für Immunglobulin G (IgG), auf einer Vielzahl von NK-Zellen im Blut, diesen eine starke Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) gegenüber IgG-markierten Zielzellen (Perussia 1998).

## B. EINLEITUNG

---

### 1.2.2 Sekretorische Aktivität der Natürlichen Killerzellen

Neben ihrer zytotoxischen Aktivität sezernieren NK-Zellen eine Reihe von Zytokinen, wie z.B. den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der am Anfang proinflammatorischer Zytokin-Kaskaden steht (O'Shea, Ma et al. 2002) sowie den Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) (Moretta 2002) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), das die Differenzierung von T-1-Helferzellen anregt, die Expression der Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (MHC) steigert (Rock, York et al. 2002) und eine starke antimycobakterielle und antivirale Wirkung besitzt (Dorman, Picard et al. 2004) (Novelli and Casanova 2004). Daneben werden von NK-Zellen Interleukin-5 (IL-5), IL-6, IL-10 und IL-13 sowie die Chemokine MIP-1 $\beta$  und IL-8 (Robertson 2002) sezerniert. Durch die Freisetzung von Zytokinen (Biron, Nguyen et al. 1999) (Shi, Wang et al. 2000), aber auch durch direkte Interaktion mit anderen Zellen des erworbenen Immunsystems, wie zum Beispiel den Dendritischen Zellen, haben NK-Zellen einen indirekten Einfluss auf die adaptive Immunantwort (Bryceson, March et al. 2006).

### 1.3 Überblick über die Rezeptoren der Natürlichen Killerzellen

NK-Zellen müssen die Fähigkeit besitzen, zwischen infizierten bzw. transformierten und gesunden Zellen zu unterscheiden. Im Sinne der in Abschnitt 1.1 beschriebenen „*missing self*“ Hypothese kommt den inhibitorischen Rezeptoren bei der so genannten Selbst-Toleranz zusammen mit der Expression von MHC Klasse-I-Molekülen eine überragende Rolle zu (Raulet 2006; Yokoyama and Kim 2006). Die inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen werden zum größten Teil von den Genen des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes (*leukocyte receptor complex*, LRC) auf Chromosom 19q13.4 und dem Natürlichen-Killerzell-Komplex (*natural killer cell complex*, NKC) auf Chromosom 12p13.1-p13.2 kodiert. Die Rezeptoren im LRC gehören zur Familie der Immunglobulin-(Ig)-ähnlichen Rezeptoren (KIR) und zur C-Typ-Lektin-Rezeptorfamilie im NKC.

#### 1.3.1 Liste der NK-Zellrezeptoren

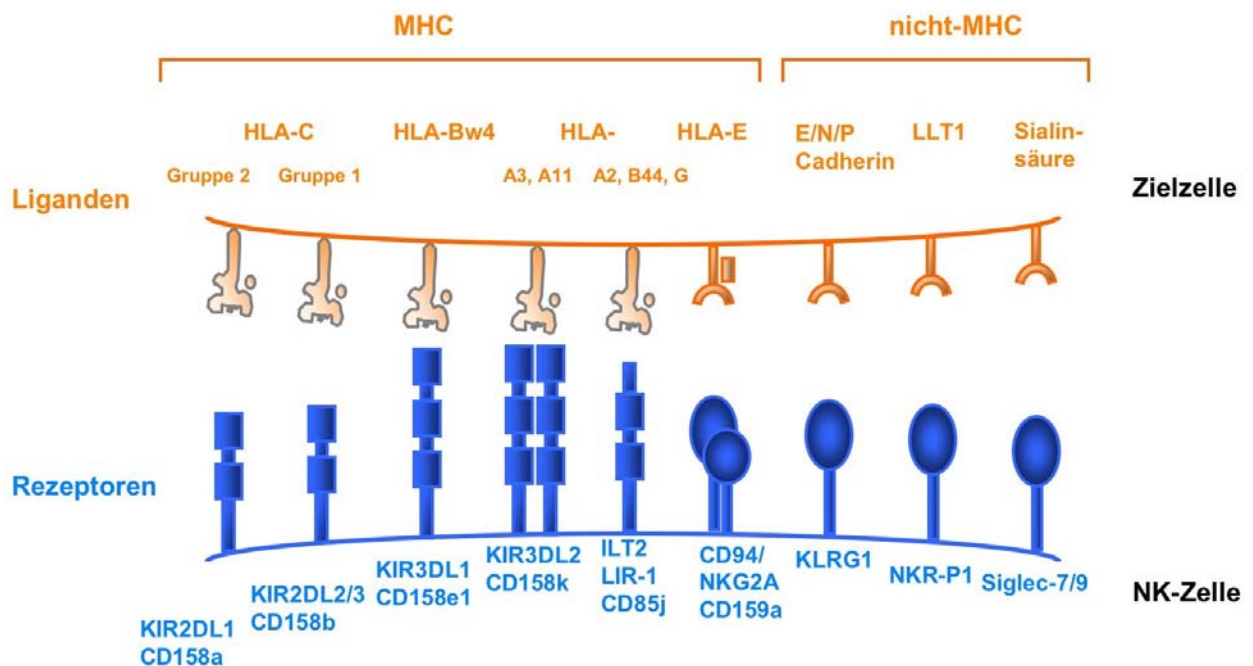
In den nachfolgenden Tabellen (TA1, TA2) sowie den Abbildungen A1 und A2 sind die bisher bekannten NK-Rezeptoren und ihre Liganden aufgeführt.

## B. EINLEITUNG

### 1.3.1.1 Inhibierende NK-Zellrezeptoren

	Rezeptor	Ligand	
ITIM	KIR2DL1	HLA-C Gruppe 2	MHC
	KIR2DL2/3	HLA-C Gruppe 1	
	KIR3DL1	HLA-B Allele	
	KIR3DL2	HLA-A Allele	
	LIR-1/ILT2	Multiple HLA-Klasse-I	
	CD94/NKG2A	HLA-E	
	KLRG1	E/N/P-Cadherin	nicht-MHC
	NKR-P1 (CD161)	LLT1	
	Siglec-7	Sialinsäure	
	Siglec-9	Sialinsäure	
	iRp60	unbekannt	
	LAIR-1	Kollagen Typ IV	

**Tabelle TA1:** Liste der bekannten inhibierenden NK-Zellrezeptoren und ihrer Liganden und Korezeptormoleküle. KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1, KIR3DL2, LIR-2/ILT-2 und CD94/NKG2A binden sämtlich an MHC-Moleküle der Klasse-I. KLRG1, NKR-P1, Siglec-7 und -9 sowie iRp60 binden jeweils an unterschiedliche nicht-MHC-Moleküle.



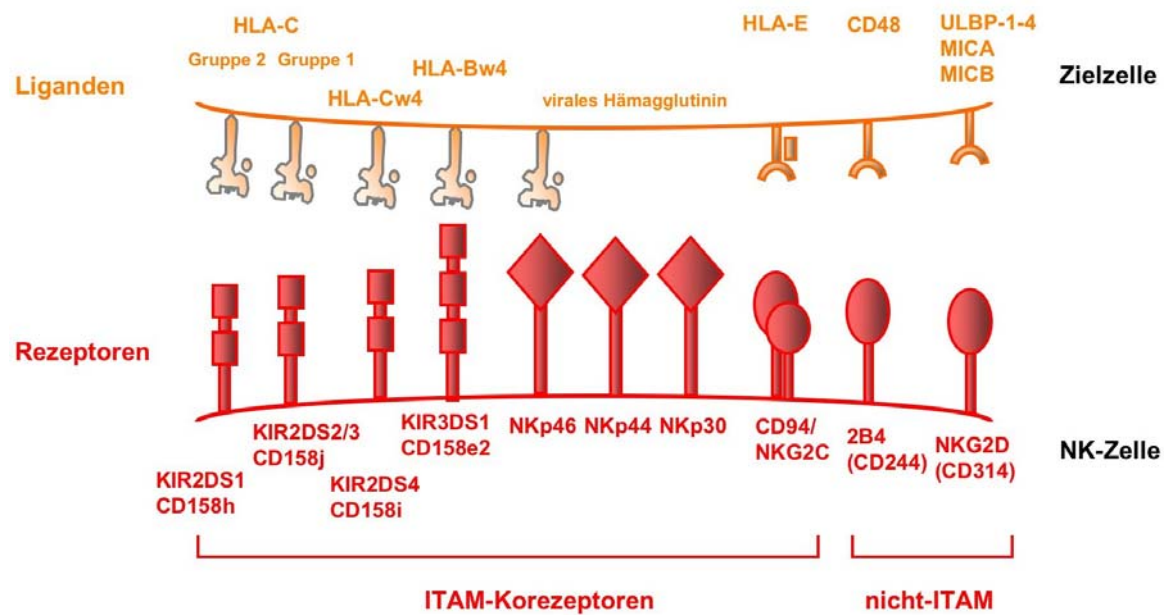
**Abbildung A1:** Inhibierende NK-Rezeptoren und ihre Liganden.

## B. EINLEITUNG

### 1.3.1.2 Aktivierende NK-Zellrezeptoren

	Rezeptor	Ligand
ITAM	KIR2DS1-2	HLA-C niedrige Affinität
	KIR2DS3,5,6	unbekannt
	KIR2DS4	HLA-Cw4
	KIR3DS1	unbekannt
	CD94/NKG2C	HLA-E
	NKp30	unbekannt
	NKp44	Hämagglutinin
	NKp46	Hämagglutinin
	CD16 (FcγRIIIA)	IgG
nicht-ITAM	NKG2D	ULBPs, MICs
	2B4	CD48
	CD2	LFA-3
	CRACC	CRACC
	NTB-A	NTB-A
	CD7	SECTM1, Galectin
	DNAM-1	CD155 (PVR)
	KIR2DL4	HLA-G
	CD44	Hyaluronsäure
Integrin	LFA-1 (CD11c/CD18)	ICAM-1-5
	MAC-1	ICAM-1, Fibrinogen
	VLA-4	VCAM-1, Fibronectin
	VLA-5	Fibronectin

**Tabelle TA2:** Liste der bekannten aktivierenden NK-Rezeptoren und ihrer Liganden sowie Korezeptoren.



**Abbildung A2:** Aktivierende NK-Zellrezeptoren und ihre Liganden.

### 1.3.2 Familie der Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (KIR)

Die 15 bisher bekannten *KIR*-Gene (sowie zwei Pseudogene) sind auf dem KIR-Locus auf Chromosom 19q13.4 in einer 150 kb großen Region lokalisiert. Von diesen 15 Genen kodieren 11 für Rezeptoren mit zwei Immunglobulindomänen (*KIR2D*-Gene) und vier für Rezeptoren mit drei Domänen (*KIR3D*-Gene) (Marsh, Parham et al. 2003). Die *KIR*-Genfamilie lässt sich weiter aufgrund ihrer Funktion in inhibierende und aktivierende KIR unterteilen. Die Liganden der inhibierenden und aktivierenden KIRs sind HLA-Klasse-I-Moleküle, wobei die aktivierenden KIR eine geringere Affinität für HLA-Klasse-I aufweisen. Nur für vier KIR-Rezeptoren sind die Liganden eindeutig bestimmt worden (Moretta, Vitale et al. 1993; Moretta, Sivori et al. 1995; Uhrberg 2005), wobei es sich bei diesen um inhibitorische Rezeptoren handelt.

#### 1.3.2.1 Inhibierende KIR-Rezeptoren (iKIR)

Die Gruppe der inhibierenden KIR-Rezeptoren umfasst die Isoformen KIR2DL und KIR3DL der CD158-Familie mit je zwei bzw. drei Immunglobulin-(Ig)-ähnlichen Domänen (D) und langer zytoplasmatischer Domäne (L für *long*) (Andre, Biassoni et al. 2001). Die lange zytoplasmatische Domäne der inhibierenden KIRs weist ein Tyrosin-haltiges inhibierendes Motiv (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*, ITIM, YXXL) auf, das nach Bindung des Liganden an den Rezeptor inhibitorische Signale weitervermittelt, die zu einer allgemeinen Deaktivierung der NK-Zellfunktion führen (Lanier 1998). Das ITIM wird bei diesem Vorgang von membranständigen src-Kinasen (lck, fyn) phosphoryliert, wodurch die Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 an den Rezeptorkomplex binden können, wobei es durch Dephosphorylierung aller nachgeschalteten Signalkomponenten zur Abschaltung der Effektorwirkung der NK-Zellen kommt (Moretta, Mingari et al. 1996; Long 1999; Blery, Olcese et al. 2000; Lanier 2003).

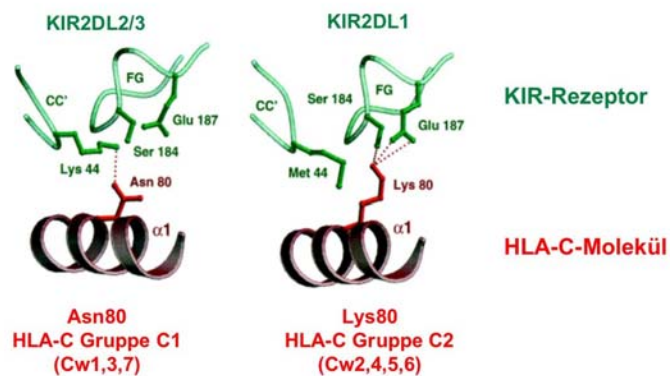
#### 1.3.2.2 Liganden der inhibierenden KIRs

KIR2DL2 sowie KIR2DL3 (p58.2/CD158b) binden alle HLA-C-Alleleprodukte, die mit einem Serinrest an Position 77 der Aminosäuresequenz und einem Asparaginrest an Position 80 der schweren Kette (HLA-C<sup>Ser77/Asn80</sup>) ausgestattet sind und HLA-C Gruppe 1 genannt werden. Dagegen bindet KIR2DL1 (p58.1/CD158a) an HLA-C-Moleküle der Gruppe 2, die durch einen Asparaginrest an Position 77 und einen Lysinrest an der Position 80 (HLA-C<sup>Asn77/Lys80</sup>) gekennzeichnet sind (Moretta, Ciccone et al. 1992; Colonna, Borsellino et al. 1993; Biassoni, Falco et al. 1995; Wagtmann, Rajagopalan et al. 1995). Die HLA-C-Moleküle der Gruppe 1



## B. EINLEITUNG

werden durch die Allelprodukte Cw1, 3, 7, 12 repräsentiert, die der Gruppe 2 durch Cw2, 4, 5, 6. Für die Erkennung der beiden HLA-C-Gruppen ist auf Rezeptorseite die Aminosäureposition 44 der Ig-Domäne (D0) entscheidend (Fan, Mosyak et al. 1999; Saulquin, Gastinel et al. 2003). KIR3DL1 (p70/CD158e1) erkennt HLA-B-Alloypen mit dem serologischen Bw4-Motiv (HLA-Bw4) (Cella, Longo et al. 1994; Gumperz, Litwin et al. 1995). Auch im Fall der HLA-B-Allele ergibt sich aufgrund eines Unterschiedes in der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ 1-Domäne (Aminosäuren 79 – 83) eine Aufteilung in zwei Gruppen (HLA-Bw4 und Bw6). Für HLA-Bw6-Allelprodukte ist jedoch bisher kein spezifischer Rezeptor bekannt (Moretta, Ciccone et al. 1994; Pende, Biassoni et al. 1996). KIR3DL2 (p140/CD158k) bindet HLA-A3 und -A11, letzteres jedoch nur, wenn spezifische virale Peptide mit dem HLA-Molekül assoziiert sind (Pende, Biassoni et al. 1996; Hansasuta, Dong et al. 2004).



**Abbildung A3:**  $\alpha$ 1-Domänen der HLA-C-Moleküle der Gruppe C1 bzw. C2 mit den für die Spezifität der Bindung an die KIR-Rezeptoren entscheidenden Aminosäureresten Asparagin 80 (Gruppe C1) und Lysin 80 (Gruppe C2) und die jeweils korrespondierende Bindungstasche der KIR-Rezeptoren KIR2DL2/3 und KIR2DL1 mit den an der Bindung beteiligten Aminosäureresten (Boyington und Sun, 2002).

### 1.3.2.3 Aktivierende KIR-Rezeptoren (aKIR)

Die aktivierenden Rezeptoren KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DL4, KIR2DS4, KIR2DS5 und KIR3DS1 mit kurzem zytoplasmatischem Teil (S für *short*) sind über ihren Transmembranteil mit Adaptermolekülen verknüpft, die aktivierende Tyrosin-haltige Immunrezeptor Motive (immunoreceptor tyrosin-based activating motif, ITAM) umfassen und aktivierende Signale über die Rekrutierung der Tyrosinkinasen Syk und ZAP-70 ( $\zeta$ -assoziiertes Protein, 70kDa) weiterleiten (Bottino, Castriconi et al. 2005; Lanier 2005).

### 1.3.2.4 Liganden der aktivierenden KIR-Rezeptoren

Die aktivierenden Rezeptoren besitzen im Allgemeinen eine geringere Affinität für HLA-Liganden. So binden KIR2DS1 (p50.1/CD158h) und KIR2DS2 (p50.2,3/CD158j) mit geringerer Affinität an dieselben HLA-C-Liganden wie KIR2DL1 und KIR2DL2/3 (Bianconi, Pessino et al. 1997; Vales-Gomez, Erskine et al. 2001; Stewart, Laugier-Anfossi et al. 2005). Der möglicherweise transient an der Oberfläche exprimierte Rezeptor KIR2DL4 bindet *in vitro* im Endosomenkompartiment an lösliches HLA-G, wodurch es zur Freisetzung proinflammatorischer und die Angiogenese unterstützender Zytokine kommt (Rajagopalan and Long 1999; Rajagopalan, Bryceson et al. 2006). Aufgrund der Zytokinfreisetzung gilt KIR2DL4 trotz seiner langen zytoplasmatischen Domäne als aktivierender KIR-Rezeptor. KIR2DS4 (CD158i) bindet gleichzeitig an MHC-Klasse-I- (HLA-Cw4) und nicht-MHC-Klasse-I-Liganden (auf Melanomzellen) (Katz, Markel et al. 2001; Katz, Gazit et al. 2004). In der Literatur finden sich Hinweise, dass KIR3DS1 (p70/CD158e2) HLA-Bw4-Allele bindet, neueste Untersuchungen haben dies jedoch im Fall von EBV-transformierten HLA-B positiven Zelllinien nicht zeigen können (O'Connor, Guinan et al. 2007). Die Liganden für KIR2DS3 (p50.2,3/CD158j) und KIR2DS5 (CD158g) sind bisher unbekannt (Khakoo and Carrington 2006).

### 1.3.2.5 KIR-Haplotypen

Alle KIR-Gene weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf (85-99%) und sind tandemartig angeordnet, was eine Entwicklung aufgrund nicht-allelischer, homologer Rekombination nahe legt (*non-allelic homologous recombination*, NAHR) (Carrington and Cullen 2004; Uhrberg 2005). Die NAHR gibt eine Erklärung für die polygene Natur der KIR-Haplotypen (Martin, Bashirova et al. 2003). Als Haplotyp bezeichnet man einen Satz von eng verknüpften genetischen Markern, die sich auf einem einzelnen Chromosom befinden und zusammen vererbt werden (Übersicht der KIR-Haplotypen im Anhang, Abbildung I.1). Der KIR-Genlocus wird von zwei „Rahmen“-KIR-Genen (KIR3DL3 und KIR3DL2) flankiert, die in allen Haplotypen vorkommen. Zwei weitere Gene (KIR2DL4 und KIR3DP1), die auch als Rahmengene bezeichnet werden, befinden sich in der Mitte des Genlocus und sind auch in allen Haplotypen vorhanden. Die KIR-Haplotypen können aufgrund des Gengehalts in zwei Hauptgruppen unterteilt werden.

Der häufigste Haplotyp (Gruppe A) umfasst zwei potentiell aktivierende KIR-Gene, KIR2DL4 und KIR2DS4, wobei KIR2DL4 im endosomalen Kompartiment lokalisiert ist und nur transient auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert wird (Rajagopalan, Bryceson et al. 2006) sowie fünf inhibitorische KIR-Gene, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 und KIR3DL3 (Uhrberg,

## B. EINLEITUNG

---

Valiante et al. 1997). Von KIR2DS4 existieren sowohl intakte Allele (\*001, \*002) als auch Null-Allele (\*004, \*005, \*006), die durch eine Deletion mit einer Größe von 22 Basenpaaren im Exon 5 entstehen (Hsu, Liu et al. 2002; Maxwell, Wallace et al. 2002) und mit einer Häufigkeit von etwa 84% in der europäischen und amerikanischen Bevölkerung auftreten. Dies führt dazu, dass viele Individuen mit dem Haplotyp A keinerlei aktivierenden KIR-Rezeptor besitzen, sofern eine homozygote Deletionsvariante vorliegt.

Haplotyp B zeigt hingegen eine große Vielfalt in Bezug auf den Gehalt und die Zahl der KIR-Gene (Uhrberg, Parham et al. 2002; Carrington and Martin 2006) und umfasst sämtliche von Haplotyp A abweichenden Haplotypen, die sich durch die Zahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren (2 bis 7), bei gleicher Anzahl inhibierender Rezeptoren wie Haplotyp A, unterscheiden.

Da die KIR-Gene stochastisch unabhängig auf NK-Zellen exprimiert werden und die Frequenz der Expression eines spezifischen KIR-Gens nicht, oder nur in geringem Maße von MHC-Klasse-I Molekülen beeinflusst wird, kann eine Person, die zwei Kopien eines spezifischen KIR-Gens oder -Allels besitzt, eine größere Zahl von NK-Zellen besitzen, die den entsprechenden KIR-Rezeptor aufweisen, im Vergleich zu einer Person, die nur eine Kopie des KIR-Gens besitzt. Die Diversität der NK-Zellen ergibt sich aus dieser individuellen Rezeptorexpression, die als Plastizität bezeichnet wird.

### 1.3.3 C-Typ-Lektin-Rezeptoren

Zu den im NKC-kodierten C-Typ-Lektin-Rezeptoren gehören die Heterodimere CD94/NKG2A, CD94/NKG2C und das Homodimer NKG2D. CD94 wird auf allen NK-Zellen exprimiert, kann allerdings nicht nur mit dem inhibitorischen NKG2A-Rezeptor sondern auch mit dem aktivierenden Rezeptor NKG2C ein Heterodimer ausbilden.

#### 1.3.3.1 Das inhibitorische Heterodimer CD94/NKG2A

CD94/NKG2A stellt einen inhibitorischen Rezeptorkomplex dar, der für die Bindung an das nicht-klassische MHC-Klasse-Ib-Molekül HLA-E verantwortlich ist. NKG2A (CD159a) leitet über eine zytoplasmatische ITIM-enhaltende Domäne das inhibitorische Signal durch Rekrutierung von SHP-1 weiter (Ravetch and Lanier 2000; Bryceson, March et al. 2006). HLA-E benötigt für seine stabile Expression auf Zellen Nonamerpeptide, die in diesem speziellen Fall aus den „Leader“-Peptiden anderer HLA-Moleküle stammen. Somit nimmt HLA-E eine besondere Rolle unter den MHC-Molekülen ein (Braud, Allan et al. 1998).

### 1.3.3.2 Der aktivierende Heterodimerkomplex CD94/NKG2C

Der aktivierende Heterodimerkomplex CD94/NKG2C (CD159c) besitzt drei extrazelluläre Domänen und assoziiert mit der ITAM-enthaltenden Adapterkette DAP12. Der NKG2C-Komplex bindet wie der NKG2A-Komplex HLA-E-Moleküle, wobei die Affinität des aktivierenden Dimers für den gemeinsamen Liganden geringer ausfällt. Die Tyrosinreste des ITAM-Motivs von DAP12 werden nach Rezeptor-Ligand-Bindung durch Src-Familie Tyrosinkinasen phosphoryliert und es kommt zu einer Rekrutierung von Syk- und ZAP70-Signalmolekülen. Die resultierende Signalkaskade aktiviert zahlreiche Signalwege, auch unter Beteiligung von ERK (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK) (McVicar, Taylor et al. 1998; Bouchon, Hernandez-Munain et al. 2001). Interessanterweise scheint DAP12 im Maussystem jedoch auch an der Weiterleitung inhibitorischer Signale beteiligt zu sein, weshalb man von einer dualen Funktionalität von DAP12 ausgeht (Fuchs, Cella et al. 2005; Hamerman and Lanier 2006).

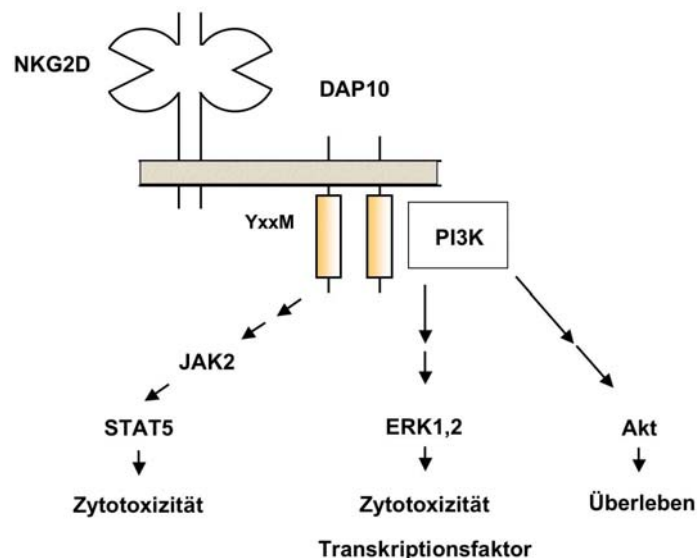
Da CD94 von allen NK-Zellen exprimiert wird, stellt sich die Frage, ob es zu einer bevorzugten Assoziation von CD94 mit einem bestimmten NKG2-Molekül kommt. Das Verhältnis von CD94/NKG2A (inhibierend) zu CD94/NKG2C (aktivierend) beträgt ca. 10 : 1, da der inhibitorische Komplex aus CD94/NKG2A häufig als Sicherungssystem von solchen NK-Zellen exprimiert wird, die keine KIR exprimieren und daher potentiell autoreaktiv sein können (Valiante, Uhrberg et al. 1997). Durch die gegenüber NKG2C erhöhte Anzahl von NKG2A-positiven NK-Zellen besteht die Möglichkeit, die Autoreaktivität durch Abschaltung dieser NK-Zellen über HLA-E einzufangen.

### 1.3.3.3 Der aktivierende Rezeptor NKG2D

Das humane Homodimer NKG2D (CD314) assoziiert mit dem, wie DAP12 im LCR auf Chromosom 19q13.4 kodierten Adapterprotein DAP10, dass ein Bindungsmotiv für die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) besitzt und somit im phosphoryliertem Zustand PI3K binden kann (Abbildung A4). Die Liganden von NKG2D sind MICA (*MHC class I chain-related gene*, MIC) und MICB und die UL16-Bindeproteine ULBP1-4 (*unique long 16-binding protein*, ULBP). Diese Liganden finden sich auf einigen Tumorzellen sowie auf infizierten Zellen (Cerwenka and Lanier 2003; Upshaw, Arneson et al. 2006). Die MIC-Proteine besitzen drei  $\alpha$ -Domänen, die strukturell denen der klassischen MHC-Proteine ähneln, jedoch keine Peptide binden bzw. nicht mit  $\beta$ 2m-Mikroglobulin assoziieren. Die humanen Proteine ULBP1, 2, 3 besitzen keine Transmembranregion, sondern sind mittels GPI-Ankern in der Membran verankert (Bacon, Eagle et al. 2004). Das Haut-spezifisch exprimierte ULBP4 enthält jedoch zytosolische Domänen sowie eine Transmembranregion (Chalupny, Sutherland et al. 2003). Die

## B. EINLEITUNG

Erkennung verschiedener Liganden durch NKG2D erfolgt mittels fünf konservierter Stellen (*hot spots*) innerhalb der NKG2D-Bindungstasche. Das auch auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der Maus exprimierte NKG2D besitzt, basierend auf der Assoziation mit DAP10 bzw. DAP12 entweder stimulatorische oder kostimulatorische Eigenschaften (Groh, Rhinehart et al. 2001; Ho, Carayannopoulos et al. 2002). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen, die mit Liganden für NKG2D transfiziert wurden *in vivo* eine antitumorale Immunreaktion auslösten (Cerwenka, Baron et al. 2001; Diefenbach, Jensen et al. 2001). Die Bindung von ULBPs und MICs an NKG2D auf NK-Zellen führt zu einem Aktivierungssignal, das die, durch die Bindung von MHC-Klasse-I-Molekülen an inhibitorische NK-Rezeptoren bedingten inhibitorischen Signale gegebenenfalls überschreiben kann. Dadurch kann es zu einer NK-Immunantwort gegenüber infizierten, unter Stress stehenden Zellen kommen, die ULBP- und MIC-Moleküle exprimieren (Chalupny, Sutherland et al. 2003).



**Abbildung A4:** Schematische Darstellung des Homodimers NKG2D und des assoziierten Adaptermoleküls DAP10 mit nachfolgender Signalkaskade.

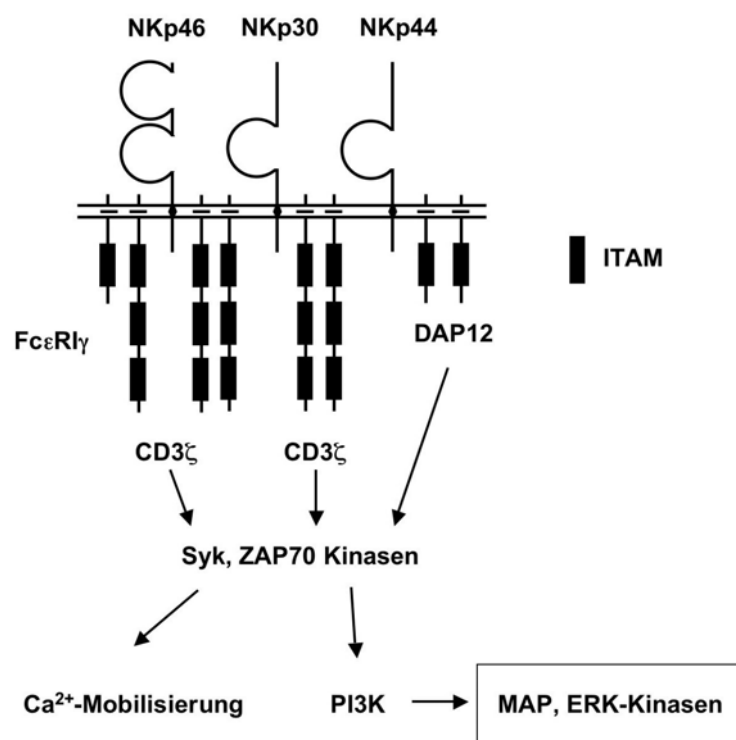
### 1.3.4 Aktivierende Rezeptoren der Ig-Superfamilie

#### 1.3.4.1 Natürliche-Zytotoxizitäts-Rezeptoren

Die Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCRs) NKp30 (CD337), NKp44 (CD334) und NKp46 (CD335) gehören zur Ig-Superfamilie und stellen die einzigen für NK-Zellen spezifischen Marker dar. Sie assoziieren mit unterschiedlichen Signal-Adaptermolekülen: NKp30 und NKp46 mit CD3 $\zeta$ , NKp46 darüber hinaus mit CD3 $\zeta$ -Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ - und NKp44 mit DAP12 (Moretta, Bottino et al. 2001). Obwohl die Liganden der NCRs weitgehend unbekannt sind, ist eine Bindung von NKp44 und NKp46 an Hämagglutinin von Influenza- und

## B. EINLEITUNG

Sendai-Viren bekannt (Mandelboim, Lieberman et al. 2001; Arnon, Achdout et al. 2004), wobei die Bindung von NKp46 über Sialinsäure-Modifikationen des Moleküls erfolgt. Die Funktion der auf allen NK-Zellen exprimierten Rezeptoren NKp30 und NKp46 und dem nur nach Aktivierung (z.B. mittels IL-2) exprimierten NKP44-Rezeptor wurde durch Induktion der Zytotoxizität IL-2-stimulierter NK-Zellen nach Stimulation mit spezifischen Antikörpern gegen genannte Rezeptoren nachgewiesen. Eine Stimulation der NCRs auf ruhenden NK-Zellen führte jedoch zu keiner wirksamen Zytotoxizität (Bryceson, March et al. 2006; Bryceson, March et al. 2006). Die Weiterleitung der Signale der NCRs erfolgt über die ITAM-enhaltenden Adaptermoleküle DAP12 und CD3 $\zeta$  über Syk und ZAP70 Kinasen und führt nach Aktivierung der PI3-Kinase zur Phosphorylierung von MAP- und ERK-Kinasen (Abbildung A5).



**Abbildung A5:** Schematische Darstellung der Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren NKp30, 44, 46 und der mit ihnen assoziierten Transmembranadaptermoleküle sowie der Verlauf der Signaltransduktion nach Stimulation der aktivierenden Rezeptoren.

### 1.3.4.2 Aktivierende Rezeptoren der CD2-Familie, 2B4 (CD244)

Die zur Familie der SLAM-verwandten Rezeptoren (*signaling lymphocyte activation molecule*, SLAM, SRRs), einer Untergruppe der CD2-Familie, gehörenden Rezeptoren 2B4 (CD244), NTB-A (*NK, T-, B-cell anitgen*, NTB-A), CRACC (CD319) und DNAM-1 (CD226) sind aktivierende Rezeptoren, die keine eigenen ITAM-Domänen besitzen oder nicht mit ITAM-enhaltenden Molekülen assoziieren (Stark and Watzl 2006). Der Signalweg von CD2 ist

## B. EINLEITUNG

---

weitgehend unbekannt, es bindet jedoch an LFA-3 (*leukocyte function-associated antigen-3*, CD58). 2B4 (CD244), dessen Signalübertragung sich grundlegend von der anderer aktivierender Rezeptoren unterscheidet, rekrutiert das SLAM-assoziierten Protein (SAP) sowie Fyn mittels zytoplasmatischer Immun-Tyrosin-basierter Schaltermotive (ITSM) (Chen, Relouzat et al. 2004; Eissmann, Beauchamp et al. 2005) und leitet das Signal so in den PI3K-Weg weiter. CD48, der Ligand von 2B4 (CD244), wird auf hämatopoetischen Zellen exprimiert (Brown, Boles et al. 1998). Die Bindung von Liganden an 2B4, NTB-A und CRACC induziert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen (Stark and Watzl 2006).

### 1.3.5 Inhibitorische Rezeptoren der Ig-ähnlichen Transkript-Familie (ILT, LIR)

Die Rezeptoren der Ig-ähnlichen Transkripte (*Ig-like transcripts*, ILT/CD85) oder Leukozyten-inhibitorische-Rezeptoren (*leukocyte inhibitory receptor*, LIR) binden an mehrere, wenn nicht sogar sämtliche HLA-Klasse-Ia-Moleküle (HLA-A, -B, -C). Ein auf NK-Zellen exprimierter inhibitorischer Vertreter ist ILT-2 (CD85j/LIR-1), der u.a. an das nicht-klassische MHC-Klasse-I-Molekül HLA-G bindet (Fanger, Cosman et al. 1998; Chapman, Heikeman et al. 1999). Die Struktur der zytoplasmatischen Domäne der Ig-ähnlichen Transkripte entscheidet wie bei den KIR darüber, ob aktivierende Signale (kurze zytoplasmatische Domäne mit assoziiertem ITAM-tragenden Molekül), oder inhibierende Signale (lange zytoplasmatische Domäne mit ITIM) weitergeleitet werden.

### 1.4 Zusammenspiel der IR und AR und Selbst-Toleranz

Jede NK-Zelle exprimiert ein für die jeweilige Zelle individuelles Muster aktivierender und inhibierender Rezeptoren, wobei alle Rezeptoren zusammen die Aktivität und Spezifität der NK-Zelle bestimmen. Um eine Selbst-Toleranz gegenüber gesunden, nicht-infizierten bzw. nicht-entarteten Zellen sicherzustellen, verfügt jede NK-Zelle über mindestens einen inhibierenden Rezeptor, der spezifisch für Selbst-HLA-Klasse-I-Moleküle ist (Valiante, Uhrberg et al. 1997). Diese bisher vorherrschende Meinung ist zurzeit Gegenstand einer Kontroverse über die zugrunde liegenden Mechanismen der Selbst-Toleranz.

Die Beobachtung, dass normale Zellen unterschiedliche Kombinationen von Liganden für inhibierende und aktivierende Rezeptoren der NK-Zellen in unterschiedlicher Expressionsstärke aufweisen und das Muster der auf NK-Zellen exprimierten IRs und ARs von Zelle zu Zelle variiert wirft die Frage auf, ob die Expression mindestens eines Rezeptors auf NK-Zellen für Selbst-MHC-Klasse-I-Moleküle („*at least one*“-Hypothese) für die Selbst-Toleranz ausreichend ist. Untersuchungen an MHC-Klasse-I defizienten Mäusen mit einer homozygoten Mutation des  $\beta 2m$ -Gens haben jedoch gezeigt, dass in diesen Organismen die NK-Zellen trotz fehlender

## B. EINLEITUNG

---

inhibierender Signale keine Autoreaktivität aufwiesen. Darüber hinaus waren die NK-Zellen aus  $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen, im Gegensatz zu NK-Zellen aus  $\beta 2m^{+/+}$ -Mäusen, nicht in der Lage, *in vivo* Con A-Blasten aus  $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen zu lysieren (Bix, Liao et al. 1991; Hoglund, Ohlen et al. 1991; Liao, Bix et al. 1991). Die NK-Zellen aus MHC-Klasse-I defizienten Mäusen zeigten allgemeine funktionelle Defekte, wie z.B. eine verminderte Fähigkeit allogene Knochenmarks-Transplantate abzustößen, eine verringerte ADCC sowie teilweise eine verminderte Fähigkeit zur Lyse entarteter Zielzellen (Dorfman, Zerrahn et al. 1997) und Defekte bei der Sezernierung von IFN- $\gamma$ , nach Stimulation durch Tumorzellen (Fernandez, Treiner et al. 2005). Da die NK-Zellen jedoch nicht vollständig funktionell beeinträchtigt waren, wurde der Begriff der „*hyporesponsiveness*“ eingeführt, also eines, durch Veränderungen und Stummschalten stimulatorischer Signalwege erreichten Zustands mit verminderter Reaktivität (Raulet, Vance et al. 2001; Fernandez, Treiner et al. 2005). Nach dieser Hypothese wären NK-Zellen hyporeaktiv gegen verschiedene Stimuli über aktivierende Rezeptoren, wenn ihnen als „Gegengewicht“ inhibitorische Rezeptoren für MHC-Klasse-I-Moleküle fehlen würden. Der zugrunde liegende Mechanismus dafür ist noch unbekannt, es wird jedoch ein Modell diskutiert, bei dem NK-Zellen durch eine persistente Aktivierung über stimulierende Rezeptoren, bei gleichzeitigem Fehlen inhibitorischer Rezeptoren hyporeaktiv werden. Raulet et al. gehen davon aus, dass es sich im Maussystem um einen aktiven, induzierten Vorgang bei reifen NK-Zellen handelt, der als „Entwaffnung“ (*disarming*) bezeichnet wird (Raulet and Vance 2006). Yokoyama et al. hingegen argumentieren, dass es sich bei hyporeaktiven NK-Zellen um unreife NK-Zellen handelt, die für eine vollständige Aktivierung erst den hyporeaktiven Zustand überwinden müssen und nennen diesen Vorgang „Lizenzierung“ (*licensing*) (Yokoyama and Kim 2006; Yokoyama and Kim 2006). Vivier et al. konnten im Humansystem reife NK-Zellen in peripherem Blut nachweisen, denen inhibitorische Rezeptoren für MHC-Klasse-I-Moleküle fehlen, die jedoch gegenüber MHC-Klasse-I defizienten Zielzellen hyporeaktiv sind. Dabei zeigte sich, dass die Expression von MHC-Klasse-I-Rezeptoren eine Unterscheidung zwischen reaktiven und hyporeaktiven NK-Zellen erlaubt und NK-Zellen nur dann eine vollständige Reaktivität gegenüber MHC-Klasse-I defizienten Zellen erlangen, wenn es zuvor zu einer Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen durch Rezeptoren auf den NK-Zellen gekommen ist. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Postulat von Yokoyama et al., bei dem durch Bindung von Selbst-MHC-Klasse-I-Molekülen an inhibitorische Rezeptoren ein positives Signal während der Reifung von NK-Zellen (Lizenzierung) ausschlaggebend ist. Beim Modell nach Vivier würde ein noch unbekannter Rezeptor mit Affinität für nicht-MHC-Moleküle eine entscheidende Rolle spielen, was jedoch bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Die Beeinflussung von Signalwegen, die hinter den NK-Zellaktivierungssignalkaskaden liegen (eingeschlossen ITAM-abhängige Signalwege), sowie auf Ebene der Transkriptionsfaktoren durch MHC-Klasse-I-KIR-Interaktionen könnte ein möglicher Mechanismus für das Lernprozess-Modell (*education*) nach Vivier et al. sein (Anfossi,



## B. EINLEITUNG

---

Andre et al. 2006). Der genaue Mechanismus der Selbst-Toleranz und Aktivierung von NK-Zellen ist also noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Diese Fragestellung hat vor allem in Bezug auf die Knochenmarktransplantation große Relevanz, da hierbei *in vivo* eine Situation im Menschen geschaffen wird, bei der das transplantierte Knochenmark sich mit dem MHC des Empfängers „auseinandersetzen“ muss und neue NK-Zellen ausreifen, die im Sinne der oben genannten Hypothesen entweder lizenziert werden oder einen Lernprozess durchlaufen müssen, um Toleranz gegenüber gesundem Empfängergewebe zu zeigen.

### 1.5 NK-Zell-Subpopulationen

Das NK-Zellkompartiment setzt sich aus zwei Subpopulationen zusammen, wobei sich diese anhand der Expression von CD56 (NCAM), einem membranständigen Glykoprotein, das zur Ig-Superfamilie gehört, und CD16 unterscheiden lassen. CD56 ist auf Lymphozyten in der 140kDa-Isoform nachzuweisen. Auf Nerven- und Muskelzellen vermittelt es die Adhäsion zwischen den Zellen. Die genaue Funktion von CD56 auf NK-Zellen ist bisher ungeklärt (Lanier, Chang et al. 1991). Zellen mit niedriger CD56-Expression werden als CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen, solche mit hoher Expression als CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen bezeichnet. Im peripheren Blut stellen CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen ca. 90% aller NK-Zellen, in Lymphknoten und Tonsillen herrscht der CD56<sup>bright</sup>-Phänotyp vor, der konstitutiv den Hochaffinitäts-Rezeptor für IL-2 exprimiert (Fehniger, Cooper et al. 2003), wodurch CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen nach Stimulation mit IL-2 stärker als CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen proliferieren. Die genannten Subpopulationen unterscheiden sich darüber hinaus aufgrund der Expression weiterer Moleküle. Die CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen exprimieren quantitativ mehr CD16 auf der Zelloberfläche als CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, die zum großen Teil CD16-negativ sind. Die KIR-Rezeptoren KIR2DL1 (CD158a) und KIR2DL2/3 (CD158b) finden sich zusammen mit KIR3DL1 (CD158e, p70, NKB1) überwiegend auf CD56<sup>dim</sup>-Zellen, wohingegen CD94/NKG2 und CD161 auf beiden Populationen exprimiert werden (CD94/NKG2A mit höherer Dichte auf CD56<sup>bright</sup>-Zellen). Das für die Migration in die Lymphknoten wichtige CD62L (L-Selektin) und CCR7 wird primär von CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen exprimiert (Cooper, Fehniger et al. 2001; Jacobs, Hintzen et al. 2001). Neben der unterschiedlichen Expression von Oberflächenmarkern, weisen die beiden NK-Zellsubpopulationen auch Unterschiede in ihrer Funktion auf. Die CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen zeigen im Vergleich zu CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen eine erhöhte zytotoxische Wirkung gegen Zielzellen, wobei CD56<sup>bright</sup>-Zellen durch IL-2 oder IL-12 Induktion *in vitro*, bzw. IL-2-Gabe bei niedriger Dosierung *in vivo*, annähernd die gleiche Zytotoxizität besitzen (Caligiuri, Zmuidzinas et al. 1990; Nagler, Lanier et al. 1990; Robertson, Soiffer et al. 1992). Darüber hinaus entfalten CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen aufgrund der CD16-Expression eine gesteigerte ADCC im Vergleich zu CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen (Nagler, Lanier et al. 1989). Die unterschiedliche zytotoxische Reaktivität der beiden

## B. EINLEITUNG

---

Subpopulationen lässt sich möglicherweise auch durch die morphologisch beobachtete höhere Granularität (lytische Granula) der CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen und die wirksamere Konjugatbildung dieser Zellpopulation mit Zielzellen erklären (Jacobs, Hintzen et al. 2001). Frisch isolierte CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen sezernieren immunregulatorische Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-13, GM-CSF (Cooper, Fehniger et al. 2001). Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass alle NK-Zellen nach Stimulation mit K-562 oder zellfreier Antikörperstimulation bzw. Induktion über IL-12 und IL-15 zytotoxisch sind und IFN- $\gamma$  freisetzen. Daher liegt es nahe CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen und CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen als „zielzellsensitiv“ und „zytokinsensitiv“ zu bezeichnen (Anfossi, Andre et al. 2006).

### 1.6 NK-Zellentwicklung

Der Phänotyp der Vorläuferzellen für NK- und T-Zellen ist Fc $\gamma$ RIII<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>, wobei die Reifung der NK-Zellen hauptsächlich im Knochenmark verläuft, nach neuesten Erkenntnisse jedoch auch im Thymus (Di Santo and Vosshenrich 2006). Wichtigste Faktoren für die Entwicklung von NK-Zellen sind IL-15, Flt3L (*fms-like tyrosine kinase 3 ligand*), SCF (stem cell factor) und IL-21. *In vitro* können zytotoxische NK-Zellen ausgehend von hämatopoetischen CD34<sup>+</sup>-Stammzellen aus dem Knochenmark, Nabelschnurblut, Blut und sekundärem lymphatischen Gewebe von Erwachsenen sowie dem Thymus durch IL-2- oder IL-15-Stimulation gewonnen werden (Freud and Caligiuri 2006). Grzywacz konnte in einem *in vitro*-Modell mit einem Stimulationscocktail aus IL-3, IL-7, IL-15, SCF und Flt3L NK-Zellen mittels CD34<sup>+</sup>-Stammzellen aus Nabelschnurblut generieren. Dabei zeigte sich nach zwei Wochen Inkubation der Verlust von CD34 und ab Tag 10 bis 14 die Expression von CD56 auf der Zelloberfläche. Nach vier bis fünf Wochen hatten alle Zellen einen CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Phänotyp und ab Tag 28 wurde auf einigen CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen CD16 exprimiert. Der zeitliche Verlauf der Expression von NK-Zell-Rezeptoren konnte in drei unterschiedliche Gruppen unterteilt werden: NKp44 und CD161 waren zu jedem Zeitpunkt auf CD56<sup>+</sup>-Zellen exprimiert, NKp30, NKp46, NKG2A, CD94 und NKG2D wurden erst im Verlauf der Zeit exprimiert und NKG2C, KIRs, CD16 und CD8 erst relativ spät in der Entwicklung der CD56<sup>+</sup>-Zellen. Es zeigte sich, dass innerhalb vier bis fünf Wochen sämtliche NKRs in unterschiedlicher Dichte auf CD56-Zellen exprimiert wurden (Grzywacz, Kataria et al. 2006). Darüber hinaus konnten zwei NK-Subpopulationen anhand der Expression von CD117 (SCF-Rezeptor, c-Kit) und CD94 unterschieden werden, wobei CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>CD117<sup>low/-</sup> die NKRs NKp30, NKp46, NKG2D, CD94 und NKG2A exprimierten, im Gegensatz zu CD56<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup>CD117<sup>high</sup>-Zellen, welche nur CD161 und NKp44 an der Oberfläche exprimierten. Daneben zeigten die beiden Subpopulationen auch funktionelle Unterschiede, wobei die CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>CD117<sup>low/-</sup>-Zellen gegenüber K-562 eine zytotoxische Aktivität besaßen. Grzywacz et al. sehen die CD56<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup>CD117<sup>high</sup>-Zellen als Vorläufer der

## B. EINLEITUNG

---

CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>CD117<sup>low/-</sup>-NK-Zellen an, wobei der Übergang von den Vorläufern in die CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>CD117<sup>low/-</sup>-Zellen eine Wechselwirkung mit Stromazellen voraussetzt. Daneben konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD94/NKG2A während der Entwicklung noch vor der Expression der KIRs auftritt.

Das Modell der NK-Zellentwicklung im Knochenmark nach Di Santo et al. umfasst dagegen drei diskrete Schritte: Festlegung hämatopoetischer Vorläuferzellen für die Entwicklung zu NK-Zellen, Expression und Kalibrierung von Rezeptoren zur Erkennung von Zielzellen auf unreifen NK-Zellen (*immature NK-cells*, iNK) und endgültige Differenzierung zu funktionell kompetenten d.h. reifen NK-Zellen (*mature NK-cells*, mNK) (Di Santo and Vosshenrich 2006).

### 2. NK-Zellen und ihre klinische Bedeutung

Die ersten klinischen Versuche zum Einsatz von *ex vivo* veränderten autologen NK-Zellen im Sinne der adoptiven Immuntherapie (*adoptive immunotherapy*, AIT) durch Expansion und Stimulation mit IL-2, und dadurch Erzeugung von LAK-Zellen (lymphokin-aktivierte Killer, LAK) wurden von Rosenberg et al. in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts an Patienten mit malignen Melanomen und Nierenzellkarzinom durchgeführt (Rosenberg 1985; Rosenberg, Lotze et al. 1985). Es zeigte sich jedoch nach Verabreichung der LAK-Zellen kein klinischer Vorteil für die Patienten. Auch der Einsatz von Hochdosis-IL-2 zur Aktivierung endogener NK-Zellen führte nicht zum Erfolg und hatte stark toxische Nebenwirkungen. Ein Grund für die unzureichende Wirkung dieser Therapieversuche ist in der verringerten zytotoxischen Aktivität der autologen NK-Zellen aus Tumorpatienten zu sehen (Papamichail, Perez et al. 2004). Darüber hinaus stellten die NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen nur einen geringen Teil (10%) der applizierten LAK-Zellen, falls die NK-Zellen nicht zuvor isoliert wurden (Bordignon, Carlo-Stella et al. 1999). *In vitro* konnte die Zytolyse von Tumorzellen durch alloreaktive NK-Zellen im Fall der chronisch-myeloischen Leukämie (chronic myeloid leukemia, CML), dem non-Hodgkin-Lymphom und dem Multiplen Myelom gezeigt werden (Caligiuri, Velardi et al. 2004).

Die Beobachtung, dass NK-Zellen ihre volle zytotoxische Aktivität nach Wegfall inhibitorischer Signale durch HLA-Liganden, die an inhibierende KIR-Rezeptoren binden entfalten können, stellt eine weitere Möglichkeit zum Einsatz von NK-Zellen in der Therapie dar (Caligiuri, Velardi et al. 2004). So zeigten Velardi et al. einen signifikanten langfristigen Nutzen bei der Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (*acute myeloid leukemia*, AML) mit Transplantaten aus haploidentisch HLA-fehlangepassten (*mismatched*) Spendern. Die T-Zell-depletierten CD34<sup>+</sup> Transplantate der Spender verbesserten das Überleben der sich in Remission befindlichen Patienten durch einen Graft-versus-Leukämie-Effekt (graft versus leukemia, GvL), bei gleichzeitig verringerter Neigung zu einer Graft-versus-Host-Erkrankung (graft versus host disease, GvHD) (Ruggeri, Capanni et al. 2005; Ruggeri, Capanni et al. 2005;

## B. EINLEITUNG

---

Ruggeri, Mancusi et al. 2005). Die Abnahme der GvHD wurde dabei der alloreaktiven Aktivität der rekonstituierten NK-Zellen gegenüber Antigen-präsentierende Zellen (APC, Dendritische Zellen) des Patienten zugeschrieben, wodurch eine Präsentation von Patientenantigenen gegenüber T-Zellen des Spenders verhindert werden soll. Im Fall der akuten lymphoblastoiden Leukämie (*acute lymphoblastoid leukemia*, ALL) konnte jedoch bisher keine eindeutige Wirkung des Protokolls nach Velardi gezeigt werden.

### 2.1 Behandlung von Leukämien

Nach der Identifizierung und der Möglichkeit zur Typisierung der humanen Leukozytenantigene (HLA) wurde zu Beginn der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts die allogene hämatopoetische Transplantation eingeführt. So konnte 1968 erstmals eine im Sinne der HLA-abgestimmte Transplantation bei einem Geschwisterpaar durchgeführt werden, wobei keine Abstoßung des Transplantats beobachtet wurde. Im darauf folgenden Jahrzehnt wurden Patienten im Endstadium einer Leukämieerkrankung durch Knochenmarktransplantation von HLA-identen Geschwistern nach Ablation des Knochenmarks des Empfängers durch Ganzkörperbestrahlung (*total body irradiation*, TBI) in Kombination mit Cyclophosphamid erfolgreich behandelt. Seitdem wurde die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation zur Behandlung vieler hämatologischer Erkrankungen eingesetzt, wobei Knochenmark als Quelle für Stammzellen in den letzten Jahren immer mehr durch Nabelschnurblut (UCB) und G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) mobilisiertes peripheres Blut als Stammzellquelle ergänzt wurde. Da die HLA-Gene zusammen auf Chromosom 6 lokalisiert sind und als Haplotypen vererbt werden, findet nach Mendel nur jeder vierte Patient einen HLA-identen Spender unter seinen Geschwistern. Daher wird auf HLA-idente nicht-verwandte freiwillige Spender, Nabelschnurblut HLA-haploidente Familienmitglieder zurückgegriffen. Die Bekämpfung und Behandlung der Leukämieerkrankung beruht auf der Fähigkeit der transplantierten Immunzellen, die durch Chemotherapie, eingeschlossen eine Gesamtkörperbestrahlung, reduzierte Zahl der Tumorzellen des Patienten bis unterhalb eines kritischen Werts zu verringern (*Graft versus Leukemia Effect*, GvL). Weiterhin dient die Chemotherapie und Bestrahlung der Unterdrückung noch vorhandener Empfänger-T-Zellen, zur Vorbeugung einer Abstoßung des Transplantats.

Nach Vorbehandlung des Patienten wird das Transplantat durch Infusion verabreicht. Neben hämatopoetischen Stammzellen umfasst das Transplantat je nach Ursprung weitere Spenderzellen, wie z.B. NK-Zellen, Monozyten, T-Zellen, Dendritische Zellen und andere Zellen. Da die T-Zellen des Spenders aufgrund ihrer Alloreaktivität jedoch zu einer GvHD, die hauptsächlich die Haut, den Verdauungstrakt und die Leber betrifft, führen können, wird der Großteil der T-Zellen depletiert. Ruggeri et al. konnten bei einem haploidenten Modell zeigen, dass die verbleibenden NK-Zellen im Transplantat bei der fehlangepassten hämatopoetischen

## B. EINLEITUNG

---

Stammzelltransplantation alloreaktiv gegen Empfänger-tumorzellen sind, jedoch keine mit T-Zellen vergleichbare GvHD auslösen (Ruggeri, Aversa et al. 2006). Die Spender T-Zellen tragen jedoch auch entscheidend zum GvL-Effekt bei.

Der Erfolg einer allogenen HSZT (hämatopoetische Stammzelltransplantation) hängt also von einer geeigneten Anpassung zwischen den Haupt-Histokompatibilitätsantigenen (MHC) des Spenders und Empfängers ab. Die MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-A, HLA-B und HLA-C präsentieren den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen Antigene. Die Klasse-II-Moleküle HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR präsentieren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen Antigene. Alloreaktiven T-Zellen können sogar von geringen Unterschieden in den Klasse-I – und Klasse-II-Molekülen aktiviert werden, wobei besonders Unterschiede in den HLA-A, HLA-B, -C oder DRB1-Allelen eine akute GvHD auslösen können. Insbesondere eine Fehlanpassung in Bezug auf HLA-A und HLA-B führt deshalb zu einem großen Risiko für den Ausbruch einer chronischen GvHD (Copelan 2006).

Da sich Spender und Empfänger, selbst bei vollständiger Anpassung im Sinne der MHC-Moleküle, aufgrund des Polymorphismus anderer Nicht-HLA-Proteine immunologisch voneinander unterscheiden können, z.B. durch Antigene, die auf dem Y-Chromosom kodiert werden (H-Y-Antigene), kann es insbesondere bei der Kombination eines weiblichen Spenders und eines männlichen Empfängers zu einer GvHD kommen (Wang, Meadows et al. 1995; Goulmy, Schipper et al. 1996; Goulmy 1997; Spierings and Goulmy 2005).

### **2.1.2 Komplikationen bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT)**

#### **2.1.2.1 Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD)**

Die GvHD unterteilt sich in die akute und chronische Verlaufsform, wobei die akute Form zwei bis fünf Wochen und die chronische Form ca. 100 Tage nach der Transplantation auftritt (Ruggeri, Aversa et al. 2006). Die akute GvHD wird bei ca. 30% aller Empfänger einer HSZT mit HLA-angepassten Transplantaten aus Geschwistern und bei 60% aller Patienten beobachtet, die mit Stammzellen nicht-verwandter Spender behandelt wurden. Sie zeichnet sich durch einen Hautausschlag, anhaltende Übelkeit und Durchfälle aus. Die akute GvHD lässt sich in Grade einteilen, wobei Grad I die beste Prognose zeigt und nur durch einen Hautausschlag gekennzeichnet ist, Grad II multiple Organe betrifft und einer Behandlung bedarf, Grad III einer schweren Multiorganerkrankung entspricht und Grad IV lebensbedrohlich ist. Die Behandlung der akuten GvHD erfolgt durch Glucocorticoide, Antithymoztenglobulin (ATG) und extrakorporale Photopherese. Der zugrunde liegende Mechanismus der GvHD lässt sich durch eine Wechselwirkung zwischen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Empfängers und Spender T-Zellen erklären. Durch die Vorbehandlung auftretende Gewebsschäden aktivieren Empfänger-APC, die Spender-T-Zellen Alloantigene präsentieren. Dadurch kommt es zu einer

## B. EINLEITUNG

---

Expansion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die TNF- $\alpha$ , IL-2 und IFN- $\gamma$  sezernieren, was zu weiteren Gewebeschäden im Empfänger führt und die Differenzierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen anregt. Diese zytotoxischen T-Zellen führen anschließend zu weiteren Gewebeschäden im Empfänger (Shlomchik, Couzens et al. 1999). Um die akute GvHD zu verhindern wird der Patient nach Transplantation mit immunsuppressiven Agenzien, wie Cyclosporin, Methotrexat oder Prednison und Anti-T-Zell-Antikörpern behandelt und vor Transplantation die T-Zellen durch T-Zell-Depletion größtenteils aus dem Transplantat entfernt. Die chronische GvHD stellt die größte Gefahr für Komplikationen nach einer HSZT dar und ist durch Bildung von Autoantikörpern, vermehrter Kollagenablagerung und Fibrose gekennzeichnet, und ähnelt anderen Autoimmunerkrankungen, wie Arthritis, Lichen sclerosus und der obliterativen Bronchitis. Sie ist durch persistente, nicht-tolerante Spender-T-Zellen bedingt, die im, durch eine akute GvHD geschädigten Empfängerthymus ausdifferenzieren.

### 2.1.2.2 Infektionen nach HSZT

Da die Zahl der Neutrophilen unmittelbar nach HSZT stark vermindert ist, sind Patienten besonders anfällig für bakterielle- oder Pilz-Infektionen. Alloreaktive NK-Zellen haben im Mausmodell jedoch zu einer verbesserten Abwehr gegenüber Infektionen geführt, wobei eine möglicherweise gleichzeitig auftretende GvHD nicht beobachtet wurde (Ruggeri, Aversa et al. 2006).

### 2.2 Haploidentische Transplantation und NK-Zell-Autoreaktivität

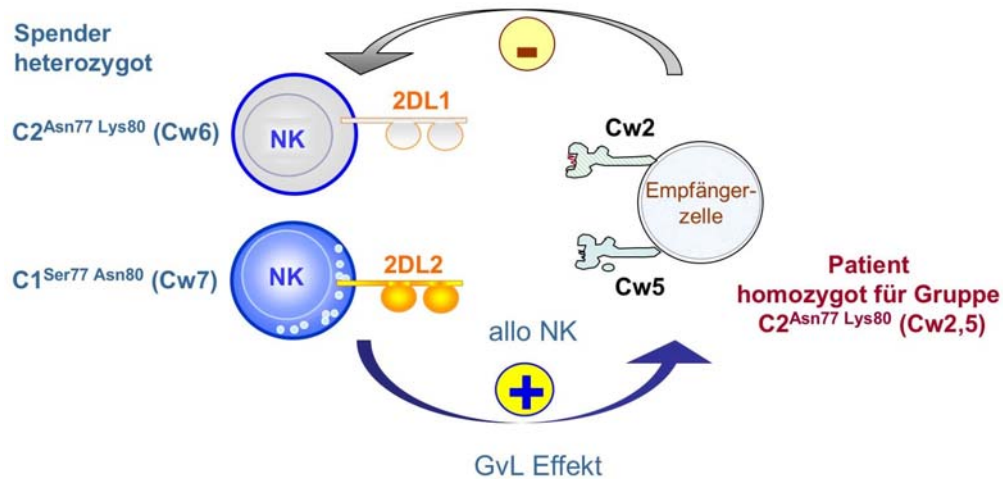
Für alle Patienten, die keinen geeigneten verwandten bzw. nicht-verwandten HLA-identen Spender finden, stellt die haploidentische Transplantation eine geeignete Behandlungsmöglichkeit dar. Dabei handelt es sich beim Spender um ein Familienmitglied, bei dem nur ein HLA-Haplotyp mit dem des Empfängers identisch ist und der HLA-Klasse-I und Klasse-II-Lokus des anderen, nicht vererbten Haplotyps unterschiedlich ist. Grundvoraussetzung ist jedoch die erfolgreiche *ex vivo* Depletion der T-Zellen aus dem zu transplantierenden Knochenmark, wobei die Rest-T-Zellpopulation nicht größer als  $2 \times 10^4$  Zellen pro Kilogramm Körpergewicht sein sollte. Das erfolgreiche Anwachsen des Transplantats wird durch die Verabreichung einer großen Zahl von bis zu  $10 \times 10^6$  Stammzellen pro Kilogramm Körpergewicht (CD34<sup>+</sup>, *mega-dose*) erzielt. Die herkömmlichen Vorbehandlungsprotokolle umfassen eine Ganzkörperbestrahlung (*total body irradiation*, TBI) und die Verabreichung von Fludarabin (Nukleosidanalogon), Thiotepa (Triphosphorsäureester, alkylierendes Zytostatikum) und Anti-T-Zellen-Antikörpern (ATG, Antithymozytenglobulin) (Kolb, Schmid et al. 2002; Ruggeri, Aversa et al. 2006). Da eine T-Zell-Depletion des Transplantats den in Abschnitt 2.1

## B. EINLEITUNG

---

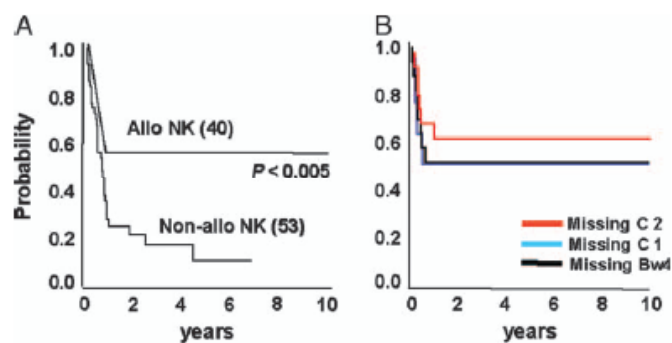
beschriebenen GvL-Effekt der T-Zellen verhindern würde, lag die Vermutung nahe, dass bei einer haploidentischen T-Zell-depletierten Transplantation keine vollständige Remission zu erreichen wäre. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass NK-Zellen die Funktion der T-Zellen eventuell übernehmen können und gleichzeitig keine oder nur in geringem Umfang eine GvHD auslösen (Ruggeri, Capanni et al. 1999; Ruggeri, Capanni et al. 2002; Velardi, Ruggeri et al. 2002). Der Mechanismus der Alloreaktivität der NK-Zellen ergibt sich hypothetisch aus der Fehlanpassung zwischen inhibitorischen Rezeptoren für Selbst-MHC-Klasse-I-Moleküle der Spender NK-Zellen und den entsprechenden MHC-Klasse-I-Liganden auf den Zellen des Empfängers. Wie schon beschrieben, führt das Ausbleiben der Bindung von Liganden an die inhibitorischen Rezeptoren zusammen mit aktivierenden Signalen über die AR zu einer zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen. Die fehlenden Selbst-MHC-Klasse-I-Moleküle auf den Empfängerzellen bei fehlangepasster allogener HSZT führen im Sinne der „missing self-recognition“ nach Kärre et al. zu einer Alloreaktivität der NK-Zellen. Wie in Kapitel 1 beschrieben, können solche NK-Zellen putativ alloreaktiv sein, die KIRs als inhibierende Rezeptoren für Selbst-HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Bei der HSZT kommt es im Sinne der Hypothese nach Velardi (KIR-Ligand-Mismatch) zu einer Alloreaktivität, wenn Spender und Empfänger im Sinne der KIR-Liganden fehlangepasst sind, d.h. das Spender NK-Zellen einen einzelnen inhibierenden KIR-Rezeptor für HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren, die im Empfänger fehlen. So würden NK-Zellen eines Individuums, das HLA-C-Gruppe 2-Allele exprimiert und dementsprechend für Gruppe 2 spezifische KIR-Rezeptoren (KIR2DL1) besitzt, in einem zweiten Individuum, dass keine Gruppe 2-Allele exprimiert, also homozygot für die HLA-C Gruppe 1 ist, alloreaktiv sein. Dementsprechend wäre auch im Fall eines Spenders, der HLA-C-Gruppe 1-Allele exprimiert und dadurch NK-Zellen besitzt, die einen für HLA-C-Gruppe 1 spezifischen KIR an der Zelloberfläche tragen (KIR2DL2), eine Alloreaktivität dieser NK-Zellen in einem homozygoten HLA-C-Gruppe 2-Empfänger zu beobachten. Gleiches gilt für den Fall, in dem HLA-Bw4-positive Spender NK-Zellen mit dem Bw4-spezifischen KIR3DL1 aufweisen, die Bw4-negative Zellen lysieren könnten. Abbildung A6 zeigt eine schematische Darstellung des „KIR-Ligand-Mismatch-Modells“ nach Velardi.

## B. EINLEITUNG



**Abbildung A6:** Schematische Darstellung des Mechanismus der NK-Zell-Alloreaktivität in Bezug auf HLA-C-Moleküle und der entsprechenden KIR-Rezeptoren.

Die Gruppe um Andrea Velardi und Loredana Ruggeri hat bei einer Untersuchung von ca. 90 haploidentischen Transplantationen, die an Hochrisiko-AML-Patienten am Knochenmarktransplantations-Zentrum in Perugia (Italien) durchgeführt wurden, einen signifikanten Überlebensvorteil bei Patienten nachgewiesen, bei denen eine Alloreaktivität von Spender-NK-Zellen aufgrund der oben genannten KIR-HLA-C-Gruppen-Fehlanpassung vorlag (Abbildung A7).



**Abbildung A7:** (A) Überlebenswahrscheinlichkeit von Hochrisiko-AML-Patienten, die haploidentisch transplantiert wurden, davon 40 mit putativ alloreaktiven NK-Zellen (Allo NK) und 53 Patienten mit nicht-alloreaktiven NK-Zellen (Non-allo NK). (B) Überlebenswahrscheinlichkeit haploidentisch transplanterter Patienten, getrennt nach Spender-versus-Empfänger NK-Allospezifität (also fehlender Expression der Spender HLA-C-Gruppe auf Empfängerzellen) (Ruggeri, Aversa et al. 2006).

Aus den in Abbildung A7 gezeigten Überlebensdaten geht hervor, dass die haploidentische Transplantation mit einem Spender, der alloreaktive NK-Zellen gegen Empfängerzellen besitzt, im Fall der AML-Erkrankung einen statistisch signifikanten Vorteil erbringt. Bei ALL-Patienten konnte kein vergleichbarer Vorteil gezeigt werden. Retrospektive Studien anderer Gruppen haben jedoch zum Teil widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf einen GvL-Effekt oder einen

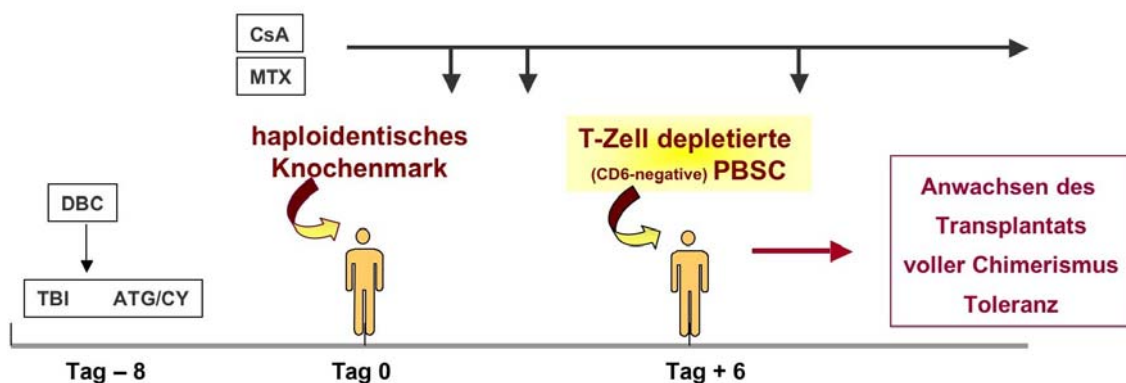


## B. EINLEITUNG

Überlebensvorteil bei der Transplantation alloreaktiver NK-Zellen gezeigt, wobei sich jedoch die zugrunde liegenden Erkrankungen, das Patientenkollektiv, die klinische Vorbehandlung, Zusammensetzung des Transplantats usw. zum Teil stark voneinander unterschieden haben (Davies, Ruggieri et al. 2002; Giebel, Locatelli et al. 2003; Lowe, Turner et al. 2003; Beelen, Ottinger et al. 2005).

### 2.3 Haploidentische Transplantation nach dem Protokoll von Prof. Dr. Kolb

Das von Prof. Dr. Hans-Jochem Kolb an der III. Medizinischen Klinik der LMU München entwickelte haploidentische Transplantationsprotokoll unterscheidet sich in einigen wichtigen Punkten von den zuvor genannten Verfahren. Mit diesem Protokoll wurden seit 1996 mehr als 100 Patienten mit unterschiedlichen Leukämieerkrankungen behandelt.



**Abbildung A8:** Schematische Darstellung des Behandlungsprotokolls nach Prof. Dr. H-J. Kolb. DBC (*donor buffy coat*), TBI (*total body irradiation*), ATG (Antithymozytenglobulin), CY (Cyclophosphamid), CsA (Cyclosporin A), MTX (Methotrexat), PBSC (*peripheral blood stem cells*).

Der Patient erhält 8 Tage vor der Transplantation haploidentischen vollen Knochenmarks, eine Infusion mit PBL eines verwandten Spenders (*donor buffy coat*), um eine Reaktion des Empfängerimmunsystems gegen die Spenderzellen zu induzieren. Das so aktivierte Immunsystem des Empfängers wird anschließend durch Ganzkörperbestrahlung (sublethal, bis zu 12Gy) und die Verabreichung von ATG und Cyclophosphamid zerstört. Am Tag der Transplantation von vollem Knochenmark des haploidentischen Spenders wird eine immunsuppressive Behandlung mit Methotrexat (Folsäureanalogon, hemmt die DNS-Replikation) und Cyclosporin A (verhindert IL-2 Bildung und wirkt auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) begonnen. Das volle Knochenmark des Spenders enthält T-Zellen, die alloreaktiv sind und eine GvHD auslösen können. Durch die Gabe eines zweiten Transplantats an Tag 6 nach Gabe des vollen Knochenmarks, bestehend aus einem T-Zell-depletierten Stammzellpräparat, das bis zu

## B. EINLEITUNG

---

60x10<sup>6</sup>-NK-Zellen enthält, wird das Anwachsen des Transplantats, ein voller Chimerismus (Vorliegen des Spenderimmunsystems im Empfänger) und Toleranz, d.h. Ausbleiben einer HvG (*host versus graft*) und GvHD erreicht (Abbildung A8).

### 2.3.1 T-Zell-Depletion des PBSC-Präparats durch den CD6-Marker

Das durch G-CSF-Mobilisierung (Dosierung: 5-12,5 µg/kg Körpergewicht) und Leukaphrese gewonnene PBSC-Präparat des Spenders wird durch das CliniMACS<sup>®</sup>-System von Miltenyi Biotec und CD6-Microbeads (an magnetische MicroBeads gekoppelte humane CD6-Antikörper MT-606, Maus IgG2a) T-Zell-depletiert. CD6 ist eine membrangebundenes Typ-I-Glykoprotein, das auf nahezu sämtlichen peripheren T-Zellen (Gimferrer, Calvo et al. 2004; Gimferrer, Ibanez et al. 2005), einigen B-Zellen und, im Zuge dieser Arbeit erstmals gezeigt, auf einer Subpopulation von NK-Zellen exprimiert wird. Bisher war bekannt, dass einige NK-Zellen CD6 exprimieren, jedoch wurde diese Subpopulation nicht phänotypisch und funktionell näher untersucht (Swack, Mier et al. 1991). Koopman et al. konnten zeigen, dass mRNA für CD6 in CD56<sup>dim</sup>- nicht jedoch in CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen exprimiert wird (Koopman, Kopcow et al. 2003). Der Ligand für CD6 ist CD166 (ALCAM), bei dem es sich um ein costimulatorisches Molekül handelt, das an der Lymphozytenaktivierung und der Thymozytenentwicklung beteiligt ist (Gimferrer, Ibanez et al. 2005). Durch die CD6-Depletion wird eine Reduzierung der CD8-positiven T-Zellen um 93,3% (Mittelwert, n = 108, Bereich: 60 – 99,99%) und eine Reduktion der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen um 98% (Mittelwert, n = 108, Bereich: 76 – 99,9%) erzielt. Gleichzeitig kommt es zu einer Anreicherung der NK-Zellen im Transplantat um 16% (Mittelwert n = 108, Bereich: 0 – 45%) und im Fall der B-Zellen um 35% (Mittelwert, n = 108, Bereich: 5,6 – 62%). Somit werden im Mittel (n = 108) 3,6 x 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie 7,7 x 10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und 21,5 x 10<sup>6</sup> NK-Zellen sowie 51,9 x 10<sup>6</sup> B-Zellen und 11 x 10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>-Stammzellen pro Kilogramm transplantiert (aus den Daten der III. Medizinische Klinik).

### 3. Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit sollte die Rolle der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bei der haploidentischen Transplantation gemäß dem Transplantationsprotokoll nach Prof. Dr. Kolb (III. Medizinische Klinik der LMU) untersucht werden. Vor Beginn dieser Arbeit war die Population der mit CD6-depletierten Stammzellpräparaten transplantierten NK-Zellen weder phänotypisch noch genau funktionell charakterisiert, noch war der Einfluss der CD6-Depletion auf die NK-Zellpopulation bekannt. Mein Ziel war es deshalb, die Population der transplantierten NK-Zellen phänotypisch und funktionell genau zu charakterisieren. Dafür sollten NK-Zellen mittels negativer NK-Isolation aus G-CSF-mobilisierten Spenderpräparaten vor und nach CD6-Depletion gewonnen werden. Das für die funktionelle Charakterisierung der isolierten Spender-NK-Zellen notwendige Vorwissen über die Funktion und den Phänotyp von NK-Zellen sollte durch Untersuchung verschiedener NK-Zelllinien in Bezug auf die Zytotoxizität, Zytokinfreisetzung und Signaltransduktion nach Stimulus erarbeitet werden. Daneben sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit ein monoklonaler Antikörper gegen einen Liganden (ULBP4) des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen erzeugt werden, um die Expression dieses Liganden auf entarteten hämatopoetischen Zellen nachzuweisen. Mit den für die Generierung und Austestung des monoklonalen Antikörpers erzeugten ULBP4-Transfektanten sollte daneben die Wirkung von ULBP4 auf die Zytotoxizität verschiedener etablierter NK-Zelllinien bestimmt werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen klinischem Ausgang der haploidentischen Transplantation und der genotypischen Konstellation der Spender-Patienten-Kombination in Bezug auf die HLA-C-Allele und KIR-Gene. Dafür sollten mit Hilfe isolierter DNS aus Spender- und Patientenzellen hochauflösend der KIR-Haplotyp sowie die HLA-C-Allele bestimmt werden. Zusammen mit klinischen Daten sollte anschließend die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten in Bezug auf die KIR-Haplotypen der Spender und die HLA-C-Allel-Kombinationen von Spender und Patient statistisch untersucht werden.

Daneben sollte mittels FACS-Analyse von Patientenmaterial die Rekonstitution und der Phänotyp der NK-Zellen im Patienten zu einem spezifischen Zeitpunkt nach Transplantation untersucht werden. Weiter sollten die schon vor Beginn dieser Arbeit vorliegenden Hinweise auf eine mögliche suppressive Wirkung von Zellen aus den CD6-depletierten Stammzellpräparaten der Spender auf die T-Lymphozyten des Spender-Knochenmarks verifiziert werden. Die Ergebnisse sollten sowohl das Verständnis für die komplizierte NK-Regulation erweitern, als auch die Bedeutung der Natürlichen Killerzellen in der speziellen Situation der Knochenmark- und Stammzelltransplantation unterstreichen.

### C. MATERIAL

#### 1. Geräte

##### Gerät

AutoMACS™  
Automatischer Zellsortierer autoMACS™  
Bakterienschüttler  
Bestrahlungsanlage Gammacell 40  
Didestilliergerät Milli-Q  
Durchflussszytometer Bio-Plex™  
Durchflussszytometer, FACSCalibur™  
Durchflussszytometer, LSR-II  
Einfrierbox  
Eismaschine AF-200  
Elektrophoresekammer EI19001  
Elektrophoresekammer, horizontal  
Filmentwicklungsmaschine M35 X-OMAT  
Gefrierschrank, -20 °C  
Gefrierschrank, -80 °C  
Geldokumentationssystem, INGENIUS  
Heizblock Thermostat 5320  
Heizplatte mit Magnet  
Inkubationsschrank  
Kühlschränke, 4 °C  
Magnet  
Mehrkanalpipetten (25-200 µl)  
Mikropipetten (0,5-10, 10-100, 20-200, 100-1000 µl)  
Mikroskop  
Mikrowelle  
Millipore-Wasser-Anlage Milli-Q  
Neubauerzählkammer  
Pipettierhilfe Pipetus-Akku  
PCR Gerät  
pH-Meßgerät  
Rollmischer  
Schüttler  
Sonicator 250-D  
Spannungsquelle LKP GPS 200/400  
Spektralphotometer  
Sterilwerkbank  
Stickstofftank Chronos Biosafe  
Stoppuhr  
Vortexer VF2  
Waagen:  
Analysewaage  
Präzisionswaage  
Ultrafiltrationssystem Typ A 8400  
Wasserbad  
Zentrifugen:  
Eppendorfzentrifuge  
Kühlzentrifuge  
Megafuge 2.0  
Bakterienzentrifuge IEC 6000B  
Sorvall RC-5B Zentrifuge  
Tischzentrifuge & Vortex

##### Firma

Miltenyi Biotech  
Miltenyi Biotech  
Infors AG  
Atomic Energy of Canada  
Millipore  
Bio-Rad  
Becton Dickinson  
Becton Dickinson  
Nalgene  
Scotsman  
Novex-Invitrogen  
Invitrogen  
Kodak  
Liebherr  
Heraeus  
Syngene, Bio Imaging  
Eppendorf  
IKA-Labortechnik  
Heraeus  
Liebherr  
Dynal  
Bibby Dunn Labortechnik GmbH  
Gilson, Socorex  
Leica DMIL  
SHARP  
Millipore  
Hecht-Assistent  
Hirschmann  
Biometra T1 Thermocycler  
pH539, WTW  
Coulter Electronics  
Biotec-Fischer  
Branson  
Pharmacia  
Amersham Biosciences  
BDK Luft- und Klimatechnik  
Messer Griesheim  
NeoLab  
IKA-Labortechnik  
  
Mettler PC440  
Mettler AE166  
Millipore-Amicon  
GFL  
  
Heraeus  
Heraeus  
Heraeus  
Nunc  
Sorvall  
NeoLab

## C. MATERIAL

---

### Gerät

Beckman LS5000TA liquid scintillation counter  
TopCount NXT Topcounter

### Firma

Beckman  
Packard

## 2. Chemikalien

### Chemikalie

Ampicillin  
APS  
Azid  
Bromphenolblau  
BSA (Bovines Serum-Albumin)  
Carboxyfluoresceindiacetat-*N*-succinimidylester  
Chloroform  
DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser  
Desoxyribonuclease I  
DMSO (Dimethylsulfoxid)  
DTT  
EDTA N<sub>2</sub>  
Ethanol  
Ethidiumbromid  
Glucose  
Glycerin 87%  
Guanidin HCl  
Hygromycin B  
Ionomycin, Kalziumsalz  
Isopropanol (2-Propanol)  
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)  
L-Lectin 100 µg/ml  
Leupeptin  
Lysozym  
L-Gluthation oxidiert  
L-Gluthation reduziert  
L-Arginin HCl  
MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O  
MES  
Methanol  
MicroScint<sup>TM</sup>400  
Chemikalie  
Natrium-Monensin  
Natriumacetat trihydrat  
Natriumazid  
Natriumchromat (Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>)  
Natriumdesoxycholat  
Paraformaldehyd  
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)  
Pepstatin A  
Phorbol 12-Myristate 13-Acetat (PMA)  
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)  
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten  
Saccharose  
TBS (Tris gepufferte Saline)  
TEMED  
Thymidin [Methyl-<sup>3</sup>H-]  
*Tri Reagent*

### Firma

Sigma  
Bio-Rad  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Merck  
Invitrogen  
Merck  
Merck  
Sigma  
Boehringer Mannheim  
Sigma  
Sigma  
Invitrogen  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Merck  
PerkinElmer  
Firma  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Hartmann Analytic  
Sigma  
Sigma  
Invitrogen  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Boehringer Mannheim  
Sigma  
Sigma  
Bio-Rad  
Hartmann Analytic  
MCR (*Molecular Research Center*),  
Inc.

## C. MATERIAL

### Chemikalie

Triton X-100  
TRIZMA HCl  
Trypanblau 0,4%  
Trypsin/ EDTA  
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)  
Harnstoff  
Vybrant™ Cell-labeling solution DID-APC  
X-Gal

### Firma

Sigma  
Sigma  
Invitrogen  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Invitrogen  
Invitrogen

## 3. Verbrauchsmaterial Molekularbiologie

### 3.1 RNS Isolierung und Reverse Transkription

#### RNS

*Tri Reagent*

Chloroform

Isopropanol

Ethanol

DEPC Wasser

#### Reverse Transkription

dNTP-Mix 10 mM

Invitrogen

DTT 0,1 M

Invitrogen

1<sup>st</sup> strand buffer 5x

Invitrogen

Oligo dT Primer 0,5 µg/µl

Invitrogen

Superscript II 200 U/ml

Invitrogen

DEPC Wasser

### 3.2 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

#### Verwendete Primer

Spezifität	Sense Primer (5'-3')	Antisense Primer (5'-3')
ULBP4	TATGTGCGACCTCCACAGTATGCG AAGAATATCCCTG	ATAGGCGGCCGCAGACTAAGACG TCCTCAA
ULBP4syn	CGGATCCATGCGGAGAATCAGCC	GTCAAGATGTCCTCAGGGGCCAC AG
β-Actin	TGACGGGGTCACCCACACTGTGC CCATCTA	CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGA TGGAGGG

#### Reagenzien

dNTP 100mM aus dATP, dTTP, dGTP, dCTP je 100mM

Invitrogen

PCR PreMix Puffer B 10x Failsafe

Biozym

Enzym-Mix 2,5 U/µl Failsafe

Biozym

Wasser bidest.

## C. MATERIAL

---

### 3.3 Gelelektrophorese

#### DNS-Gel

TAE-Puffer 50x	Invitrogen
Agarose SeaKem	BMA Biozym
1 kb Plus DNS-Leiter	Invitrogen
Auftragspuffer (Bromphenolblau)	

### 3.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Agarosegel

QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen
----------------------------	--------

### 3.5 Klonierung

#### Enzyme

Taq DNS-Polymerase 5000 U/ml	Pharmacia
T4 DNS-Ligase <i>Rapid DNS Ligation Kit</i>	Roche
<i>XhoI</i> 10 U/μl	Roche
<i>BamHI</i> 10 U/μl	Roche
T4 DNS Ligase TA Klonierungskit	Invitrogen

#### Medien und Puffer

S.O.C. Medium	Invitrogen
LB (Luria-Bertani)-Medium	Sigma
Ligationspuffer 10x TA Klonierungskit	Invitrogen
Restriktionspuffer B 10x	Roche
Restriktionspuffer H 10x	Roche
Verdünnungspuffer 5x <i>Rapid DNS Ligation Kit</i>	Roche
Ligationspuffer 2x <i>Rapid DNS Ligation Kit</i>	Roche

#### Sonstiges

dATP 100mM	Invitrogen
Ampicillin 100 mg/ml	
Agar	Sigma
Petrischalen	Greiner
Qiaprep Spin Minipräp Kit	Qiagen
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen
X-Gal 40 mg/ml (in DMF)	

#### Bakterien

DH5 $\alpha$ -T1 Bakterien	Invitrogen
----------------------------	------------

## C. MATERIAL

---

### Vektoren

pcDNA 3.1	Invitrogen
PCR-Script	Stratagene
Synthetisches Gen	
ULBP4syn	Geneart AG, Regensburg
Sequenz vergleiche Anhang Abbildung I.2	

### 3.6 HLA-C- und KIR-Typisierung

LABType® SSO C Locus, 100 Tests (RSSO1C) Lot004/Lot006  
KIR SSO Genotyping Test RSSOKIR Lot001/002  
NeoLab PCR 96-Well MTP, dünnes PP, 200µl  
NeoLab 8er Verschlussstrips für PCR MtPs  
TC-Platte 96-Well V-Shape (Cellstar)  
Taq-Polymerase (Invitrogen)

## 4. Verbrauchsmaterial Biochemie

### 4.1 Multiplex Protein-Analysen

#### 4.1.1 Bioplex-Analyse

Reagenzien Kit A  
Human 8-Plex Cytokine Repertoire  
(IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF)  
Bio-Plex Human IL-5 Assay, IL-13 Assay, MIP-1 $\beta$   
Bio-Plex Kalibrierungsskit, Abklebfolien  
96-Loch-*Multiscreen*-Platten Millipore

#### 4.1.2 Phosphoprotein-Analyse

Bio-Plex Cell Lysis Kit  
Bio-Plex Phosphoprotein Detection Reagent Kit  
Bio-Plex Phospho-ERK1&2, Phospho-ERK2(Thr<sup>185</sup>/Tyr<sup>187</sup>), Phospho-Akt(Ser<sup>473</sup>), Phospho-GSK3alpha/beta(Ser<sup>21</sup>/Ser<sup>9</sup>), Phospho-STAT3(Tyr<sup>705</sup>), Phospho-ATF-2 (Tyr<sup>71</sup>), Phospho-JNK(Tyr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>), Phospho-IkappaB-alpha(Ser<sup>32</sup>/Ser<sup>36</sup>) Assay

Abklebefolien  
96-Loch-*Multiscreen*-Platten Millipore



## C. MATERIAL

### 4.1.3 Westernblotanalyse

#### Protein-Gel

Transferpuffer 20x	Novex-Invitrogen
Laufpuffer MOPS 20x	Novex-Invitrogen
SDS-Page Standard	BioRad
Proben Puffer LDS 4x	Novex-Invitrogen
Färbung: <i>SimplyBlue</i>	Invitrogen
Trocknung: Ethanol 20%/ Glycerin 10%	
Folien	Roth
Rahmen	Roth

#### Blot

PVDF Membran Ivtrolon, 0,45µm	Invitrogen
<i>Enhanced Luminol Reagent and Oxidizing Reagent</i>	PerkinElmer
Autoradiographiekassette Gevamat	AGFA-Geveart
Autoradiographiefilm HyperFilmT <sup>TM</sup> ECL <sup>TM</sup>	Amersham Biosciences
Autoradiographiefilm Kodak, X-Omat AR-5	Radiofilm

#### Protein-Gel

10%ige Trenngel-Lösung:			Transferpuffer		
10%	(w/v)	Acrylamid	25	mM	Tris-HCl, pH 8,3
2,70%	(w/v)	Bisacrylamid	250	mM	Glycin
250	mM	Tris-HCl, pH 8,8	20%	(v/v)	Methanol
0,10%	(w/v)	SDS	0,10%	(w/v)	SDS
5	(v/v)	Glycerin			
0,40%	(v/v)	TEMED			
0,05%	(w/v)	APS			
3,75%ige Sammelgel-Lösung			TBS-Puffer		
3,75%	(w/v)	Acrylamid	10	mM	Tris-HCl
1%	(w/v)	Bisacrylamid	150	mM	NaCl
125	mM	Tris-HCl, pH 8,8			pH 8,0
0,10%	(w/v)	SDS	TBST-Puffer		
0,40%	(v/v)	TEMED	TBS-Puffer mit 0,1% Tween 20		
0,08%	(w/v)	APS			
Protein-Probenpuffer			Blockierungslösung Ge-Not		
100	mM	Tris-HCl pH 6,8	100	ml	10x NFF
2,50%	(w/v)	SDS	2,5	g	Gelatine
20%	(w/v)	Glycerin			ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
0,25%	(w/v)	Bromphenolblau			
Elektrophoresepuffer			10x NFF		
25	mM	Tris	1,5	M	NaCl
200	mM	Glycin	0,05	M	EDTA
0,10%	(w/v)	SDS pH8,3	0,5	M	Tris pH 7,5
			0,50%	(v/v)	Triton X100
Stripping Lösung			Antikörperpuffer		
2	%	SDS	1%	(w/v)	Milchpulver
100	mM	β-Mercaptoethanol			TBST
50	mM	Tris-HCl, pH 6,7			

### **Antikörper:**

#### **Detektionsantikörper (Santa Cruz)**

Phospho-Stat3(Tyr705) Antibody (Rabbit)

Phospho-GSK-3 $\alpha/\beta$ (Ser21/9) Antibody (Rabbit)

Phospho-p44/42 MAP Kinase ERK1/2 (Thr202/Tyr204) Antibody (Rabbit)

Phospho-Akt(Ser473) Antibody (Rabbit)

ERK1 C16, C14 Rabbit pAB (ERK1, ERK2)

Stat3 C20 Rabbit pAb (Stat3-Total, Rabbit)

### **Sekundärantikörper:**

ECL<sup>TM</sup> Anti-Rabbit IgG, Horseradish-Peroxidase-linked F(ab')<sub>2</sub> fragment, donkey

#### **4.1.4. Bestimmung der Proteinkonzentration**

BCA<sup>TM</sup> Protein Assay-Test

### **5. Verbrauchsmaterial Zellkultur**

#### **Plastik/Glaswaren**

Adhesive Plate Seals

Einfrierröhrchen Cryotubes 1,8ml

Glaspipetten

Lumaplates

Magnet für Zellseparation

Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 17 cm<sup>2</sup>)

Zellkulturplatten (6-Loch, 24-Loch)

Zellkulturplatten (96-Loch, Rundboden)

PerkinElmer

Nunc

Hirschmann

PerkinElmer

Dynal

Falcon

Falcon

Falcon

#### **Lösungen, Verbrauchsmedien und Zusätze**

FACS-Flow

FACS-Rinse

FACS-Puffer: PBS, 0,1% Azid, 5% FCS

Ficoll, Biocoll Separationslösung

FBS (Fötales Kälberserum)

Geneticin (G418-Sulfat) 100 mg/ml

HBSS

Heparin 25000 IE

Humanserum

Hygromycin B 50 mg/ml

IL-2, rekombinant, human (Proleukin)

IMDM

L-Glutamin 200 mM

MEM 100x

Natriumpyruvat 100mM

BD

BD

Labor C.S Falk

Biochrom AG

Invitrogen

Pan Biotech GmbH

Gibco

Invitrogen

Labor C.S. Falk

Invitrogen

Invitrogen

Gibco

Invitrogen

Invitrogen

Invitrogen

## C. MATERIAL

Negativer Isolationskit für NK Zellen, T-Zellen	Dynal
Penicillin/ Streptomycin 100 U/ml	Invitrogen
RPMI 1640	Invitrogen
Trypanblaulösung (0,4% in physiolog. Saline)	Invitrogen
Trypsin/EDTA-Lösung (10 x in PBS lösen)	Invitrogen
M450 Sheep-anti-Mouse IgG Magnetic Beads	Nexell (Dynal)

### 5.1 Medien

RPMI III Medium	Tumormedium	Selektionsmedium (SM)
RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1x MEM 10% FBS	<b>L721.221-Cw*01</b> 1 mg/ml G418 in TM <b>K-562-Cw*0304</b> 0,5 mg/ml G418 <b>K-562-E(2B4)</b> 0,5 mg/ml G418 + HygB
NKL-Medium (NKL-M)	NK-Medium	YT-Medium
RPMI 1640 100 U/ml IL-2 7,5% HS + 7,5% FBS	RPMI III 300 U/ml IL-2 7,5% HS + 7,5% FBS	IMDM 20% FBS 100 U/ml IL-2
CML-Medium	CD6 Medium	Basalmedium
RPMI III 15 % FBS	RPMI III 10% HS	RPMI III 0,5% FBS
Einfriermedium	CD6-Einfriermedium	Puffer
RPMI III 20 % DMSO	RPMI III 25% FBS 10% DMSO	Erylysepuffer 10x 155 mM NH <sub>4</sub> Cl 100 mM KHCO <sub>3</sub> 1 mM EDTA/Tritiplex H <sub>2</sub> O

### 6. Verbrauchsmaterial Allgemein

FACS-Röhrchen	Greiner
Handschuhe	Kimberly-Clark
Einmalküvetten	NeoLab
Einwegpipetten	Falcon; Greiner
Glaswaren	Schott Duran
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Greiner; Starlab
Pipettenspitzen, gestopft (10, 200, 1000 µl)	Starlab
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarsted
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner, Eppendorff
Rührfische	NeoLab
Skalpelle	Braun
Spritzen, Kanülen	BD; Braun
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon; Greiner

## C. MATERIAL

### 7. Zellen

#### 7.1 Zelllinien

##### Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium
HaCat	Humane Keratinozytenzelllinie	TM
Jurkat	T-Zell-Leukämiezelllinie	TM
K-562	Erythroleukämiezelllinie, MHC-Klasse-I-negativ	TM
K-562-Cw*0304	K-562, transfiziert mit HLA-Cw*0304	SM
K-562-E(2B4)	K-562, transfiziert mit HLA-E <sup>G</sup> -B5+B8-L-β <sub>2</sub> m	SM
L721.221	EBV transformierte B-Zelllinie, HLA-Klasse-I-negativ	TM
L721.221-Cw*01	L721.221 transfiziert mit Cw*01	SM
L721.221-Cw*06	L721.221 transfiziert mit Cw*0602	SM
L721.221-Cw*07	L721.221 transfiziert mit Cw*0702	SM
NKL	NK-Leukämiezelllinie	NKL-M
YT	NK-Leukämiezelllinie	YT
B.3NK	Allogene NK-Linie	NK-Medium

Verschiedene Varianten der EBV-transformierten B-Zelllinie L721 wurden nach Mutation durch Bestrahlung auf das Fehlen von HLA-Klasse-I- bzw. -II-Expression selektioniert, wodurch die Sublinie L721.221 erhalten wurde. Die L721.221-Linie weist eine große Deletion in den beiden auf Chromosom 6 kodierten HLA-Klasse-I-Regionen auf, was zum Verlust der Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen führt. Für die Erzeugung der L721.221-Transfektanten Cw\*6 und Cw\*7 wurden HLA-Cw\*0602 und -Cw\*0702 als genomische DNS-Fragmente in den EBV-getriebenen pHebo-Vektor kloniert, und in Selektionsmedium kultiviert (0,5 mg/ml Hygromycin B, bzw. G418).

Die Erythroleukämiezelllinie K-562 exprimiert aufgrund ihres Differenzierungsstadiums keine HLA-Klasse-I-schweren-Ketten. Die im Labor von Frau Prof. Weiß erzeugte Transfektante K-562-E wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese entstand durch Doppeltransfektion mit zwei Vektoren. Zuerst wurde mit einem, die schwere Kette des HLA-

## C. MATERIAL

EG-Alleles enthaltenden pcDNA3.1(+) Vektor K-562 transfiziert, und anschließend mit einem zweiten Konstrukt [pcDNA3.1(+)] mit einer klonierten Fusionssequenz aus dem stabilisierenden B8-Signalpeptid (VMAPRTVLL) und der, durch einen Linker getrennten,  $\beta$ 2m-Sequenz (B8-L- $\beta$ 2m)], wodurch die Oberflächenexpression von HLA-E durch die Koexpression der schweren Kette zusammen mit dem Peptid- $\beta$ 2m-Fusionsprotein stabil erzielt wurde. Die Juarkat-Zelllinie wurden von der Internationalen Zellbank (ATCC, USA) bezogen und ohne Selektionsmedium kultiviert, die NK-Leukämie Linien NKL und YT wurden freundlicherweise von Prof. Miguel Lopez-Botet und Prof. Peter Parham (University of Stanford, USA) zur Verfügung gestellt und in IL2-ergänzt Medium kultiviert Bei der B.3NK handelt es sich um eine allogene NK-Linie, die aus einer gemischten Lymphozytenkultur des Spenders B gegen Lymphozyten des Spenders 3 stammt. Diese Linie muss regelmäßig allogenen stimuliert werden, um die Proliferation aufrecht zu erhalten

### 7.2 Spender und Patienten Blut

#### Verwendete Blutproben (Normalspender)

EDTA-Blut der Normalspender (Kontrolle) wurde im Rahmen einer venösen Blutentnahme gewonnen.

Spenderkürzel	Nummer
DtM	C1
HaB	C2
HB	C3
BM	C4
CF	C5
JB	C6
RK	C7
PR	C8
TR	C9
BS	C10
WG	C11
KK	C12
AM	C13

#### Verwendete Blutproben (Patienten)

EDTA-Blut der Patienten wurde im Rahmen einer venösen Blutentnahme im Klinikum Großhadern gewonnen.

Nummer	Alter	Erkrankung	Geschlecht	Nummer	Alter	Erkrankung	Geschlecht
20P	21	ALL	m	27P	27	AML	m
X42P	41	ALL	w	26P	50	AML	w
X44P	54	AML	m	11P	36	AML	m
32P	20	MPS	m	16P	51	AML	m
17P	40	AML	w	19P	24	ALL	w

Durchschnittsalter der abgebildeten Patienten: 36,4 Jahre, m = 6, w = 4;

## C. MATERIAL

### Verwendete Blutproben (Spender)

Nummer	Alter	Geschlecht	Nummer	Alter	Geschlecht
1D	25	m	19D	48	m
2D	22	m	20D	16,8	m
3D	31	w	21D	42	w
6D	61	m	22D	20	w
5D	61	w	23D	43	w
7D	19	m	24D	53	w
8D	24	m	25D	41	w
9D	31	m	26D	53	w
10D	36	m	27D	24	m
11D	48	w	28D	49	m
12D	47	w	29D	57	m
13D	30	m	30D	36	w
14D	23	m	31D	69	w
15D	46	w	32D	45	w
16D	45,8	w	33D	38	m
17D	47,4	m	34D	29	w
18D	40,1	m	35D	23	m
			36D	46	w

Durchschnittsalter der Spender: 39,1 Jahre. m = 18, w = 17. Für Spender 4D lagen keine Proben vor.

### 8. Spender- und Patienten-DNS

Verwendete DNS-Proben siehe Anhang I.5

## C. MATERIAL

### 9. Antikörper

#### 9.1 Primärantikörper

##### Verwendete Primärantikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Synonym	Konjugation	Hersteller
Isotypkontrolle	MOPC21	IgG1		-	Sigma
Isotypkontrolle	UPC10	IgG2a		-	Sigma
HLA-Klasse I	W6/32	IgG2a		-	E. Kremmer
Isotypkontrolle	IgG2a	IgG2a		PE	Beckman
Isotypkontrolle	MOPC195	IgG2b		FITC	BD
Isotypkontrolle	7T4-1F5	IgG2a		PE	Coulter
Isotypkontrolle	X39	IgG2a		PerCP	BD
CD2	39C1.5	IgG2a		PerCP	Coulter
CD3	UCHT1	IgG1		FITC Cychrome	Beckmann BD
CD4	13B8.2	IgG1		PE APC	Beckmann J. Mysliwicz
CD6	M-T605	IgG1		PE	BD
CD8	B9.11	IgG1		PE	Immunotech
CD8cy5	GN11-134D7	IgG1		CY5	Amersham
CD14	M5E2	IgG1		FITC	BD
CD16	3G8	IgG1		FITC	Beckmann
CD19	J4.119	IgG1		FITC APC	Beckmann
CD25	B1.49.9	IgG2a	IL-2R $\alpha$	FITC PC5	Beckmann Beckmann
CD34	581	IgG1		FITC	Immunotech
CD44	37.51.1	IgG1		FITC	Beckmann
CD45RA	ALB11	IgG1		FITC	Immunotech
CD45RO	UCHL1	IgG2a		PE	Immunotech
CD45	J33	IgG1		APC	Coulter
CD56	NKH-1	IgG1		APC	Beckmann
CD69	TP1.55.3	IgG2b		PE	Beckmann
CD80	L307.4	IgG1		PE	BD
CD85d	42D1	IgG1	ILT-4	PE	Coulter
CD85j	VMP55.1	IgG1	ILT-2	FITC	DAKO
	HP-F1	IgG1		PE	Beckmann
CD86	.2331	IgG1		PE	BD
CD94	HP-3D9	IgG1		FITC	BD

## C. MATERIAL

Spezifität	Klon	Isotyp	Synonym	Konjugation	Hersteller
CD107a	H4A3	IgG1		FITC	BD
CD107a	H4A3	IgG1		PE	BD
CD122	2RB	IgG1	IL-2R $\beta$	FITC	Beckmann
CD133	293C3	IgG2b		APC	Miltenyi
CD158a	EB6	IgG1	2DL1/DS1; p58.1	PE	Beckmann
CD158b	GL183	IgG1	2DL2,3/DS2; p58.2	PE APC	Beckmann
CD158e1	Z27.3.7	IgG1	3DL1; p70; NKB1	PE	Beckmann
CD158i	FES172	IgG2a	2DS4; p50.3	PE	Beckmann
CD159	Z177	IgG2b	NKG2A	PE	Beckmann
CD161	191B8	IgG2a	NKRP-1A	PE	Beckmann
CD244	C1.7.1	IgG1	PE	2B4	Coulter
ILT-3	3579	IgG1		PerCP	Coulter
LAIR-1	DX26	IgG1		PE	BD
NKG2A <sub>mouse</sub>	20d5	IgG1		FITC	BD
NKG2D	149810	IgG1		PE	R&D
	ON72	IgG1		APC	BD
NKp30	Z25	IgG1		PE	Beckmann
NKp44	Z231	IgG1		PE	Beckmann
NKp46	BAB281	IgG1		PE	Beckmann
NKp80	239127	IgG2a		APC	RD
ULBP1	170818	IgG2a			RD
ULBP2	165903	IgG2a			RD
ULBP3	JFY02	IgG2a			RD
MICA	159227	IgG2a			RD

### 9.2 Sekundärantikörper

Spezifität	Organismus	Konjugation	Hersteller
$\alpha$ Ratte	Ziege	PE	Jackson ImmunoResearch
		APC	J. Mysliwicz



### 10. Personen- und Firmenverzeichnis

Agfa-Gevaert, Leverkusen  
Amersham, Little Chalfont, England  
ATCC, Rockville, Maryland, USA  
Atomic Energy of Canada, Ottawa, Ontario, Kanada  
Avidity  
BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl  
Bibby Dunn Labortechnik, Asbach  
Beckmann Coulter/ Immunotech, Palo Alto, Kalifornien, USA  
Becton Dickinson Biosciences (BD), San Jose, Kalifornien, USA  
Biochrom, Berlin  
Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA  
Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen  
Biozym, Hess, Oldendorf  
BmT GmbH Laborprodukte, Meerbusch-Osterath,  
Brand, Wertheim  
Branson Ultrasonics, Danbury, USA  
Braun, Melsungen  
DAKO, Glostrup, Dänemark  
Dianova, Hamburg  
Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA  
Dynal, Oslo, Norwegen  
Eppendorf, Hamburg  
Falcon, Oxnard, Kalifornien, USA  
Invitrogen, Gaithersburg, Maryland, USA  
GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden  
Geneart AG, Regensburg  
GFL Gesellschaft für Labortechnik, Großburgwedel  
Greiner, Nürtingen  
Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich  
Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig  
Hecht-Assistent, Sondheim-Rhön  
Heraeus, Hanau  
Hirschman, Unterhaching  
Hybaid, Teddington, UK  
IBA GmbH, Göttingen  
IKA Labortechnik, Staufen  
Immunotech, Minnesota, USA  
Invitrogen/ Life Technologies, Karlsruhe  
Infors AG, Bottmingen, Schweiz  
Iris Bigalke, Institut für Molekulare Immunologie, GSF, Großhadern  
Julabo, Seelbach  
Kodak, Stuttgart  
Kremmer Elisabeth, Institut für molekulare Immunologie, GSF München  
Leica, Wetzlar  
Liebherr, Biberach an der Riss  
Merck, Darmstadt  
Messer Griesheim, Krefeld  
Mettler, Gießen  
Millipore, Bedford, Massachusetts, USA  
Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach  
Nalgene, Rochester, New York, USA  
NeoLab, Heidelberg  
New England BioLabs, Herts, UK  
Novagen, Wisconsin, USA  
Nunc, Naperville, USA

## C. MATERIAL

---

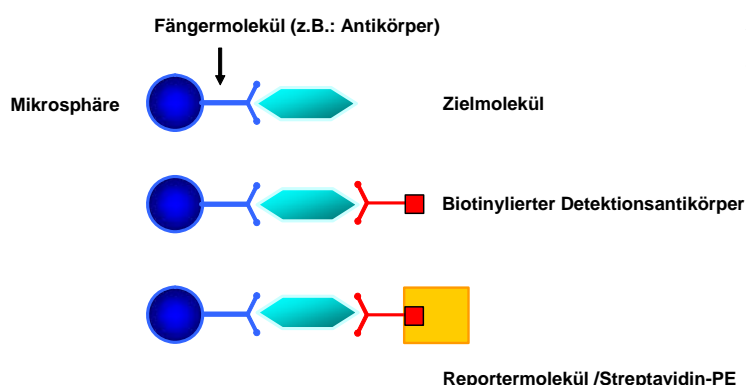
OneLambda Inc., Canoga Park, CA, USA  
PAN Biotech, Aidenbach  
PerkinElmer, Wellesley, Massachusetts, USA  
Pharmacia, Uppsala, Schweden  
PromoCell, Heidelberg  
Pierce, Rockford, IL, USA  
Qiagen, Chatsworth, Kalifornien, USA  
Radiofilm, Bad Münster  
R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA  
Roche, Mannheim  
Sartorius, Göttingen  
Scotsman, Vernon Hills, Illinois, USA  
Sharp Electronics Corporation, Mahwa, New Jersey, USA  
Serotec, Oxford, UK  
Sigma, St. Louis, Missouri, USA  
Starlab, Ahrensburg  
Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA  
VWR Internacional GMBH, Darmstadt  
Weiß Elisabeth, Institut für Anthropologie und Humangenetik, LMU-München  
Whatman Biometra, Göttingen

### D. METHODEN

#### 1. Allgemeine Methoden

##### 1.1 Multiplex-Verfahren zur Quantifizierung von Proteinen und Nukleinsäuren, Prinzip des Multiplex-Systems

Das Multiplex-System basiert auf Polymerkügelchen (Mikrosphären, 5,5 µm), die mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren so eingefärbt werden, dass die spezifische Unterscheidung einer einzelnen Mikrosphäre anhand ihrer spektralen Eigenschaften möglich ist. Ein Vorteil des Multiplex-Systems gegenüber herkömmlichen Verfahren ist die Möglichkeit zur gleichzeitigen Messung von bis zu 100 verschiedenen Analyten. An die gefärbten Mikrosphären kann ein Fängermolekül gebunden werden, dass je nach Spezifität eine Vielzahl von Molekülen binden kann (DNS, Enzymsubstrate, Rezeptoren, Antikörper, Antigen, Zytokine/Chemokine). Um das Zielmolekül qualitativ und quantitativ nachzuweisen, bindet anschließend ein mit Biotin markierter Antikörper (Detektionsantikörper) das Molekül an einem anderen Epitop. Im darauf folgenden Schritt bindet ein Reportermolekül (Streptavidin-Phycoerythrin) an den biotinylierten Antikörper. Im Multiplex-Array-Gerät (LABScan<sup>TM</sup>100) werden die Mikrosphären einzeln durch eine Kapillare an zwei Lasern (Anregungslicht: 633 nm und 532 nm) vorbeigeführt, wobei ein roter Laser die Fluorophoren in den Mikrosphären anregt und damit die Ermittlung der spektralen Adresse ermöglicht. Ein weiterer Laser regt das Reportermolekül (Phycoerythrin) an, wodurch eine Quantifizierung des gebundenen Zielmoleküls ermöglicht wird (Reporter). Die Detektion erfolgt mittels Photodioden (Klassifikation 1: 657nm, Klassifikation 2: 720 nm, Reporter 1: 580 nm).



**Abbildung D1:** Schematische Darstellung des Multiplex-Prinzips.

Mittels des Multiplex-Verfahrens wurden im Rahmen dieser Arbeit Phosphoprotein- und Zytokin-Bestimmungen sowie HLA-C- und KIR-Typisierungen durchgeführt. Eine genaue Erläuterung der Verfahren erfolgt im Verlauf des Methodenteils.

### **2. Methoden der Zellkultur**

#### **2.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultivierung**

Alle Schritte der Zellkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien an einer Sterilwerkbank durchgeführt, um so Kontamination mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **2.2 Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)**

##### **Isolierung von PBMC aus gesunden Spendern**

Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut freiwilliger gesunder Spender mittels Ficoll-Hypaque<sup>TM</sup>-Dichtegradient isoliert. Ein entsprechendes Ethikvotum der lokalen Kommission liegt vor (SFB 571). Die Abnahmeröhrchen wurden vor Blutentnahme zur Gerinnungshemmung mit 0,1 ml Heparin pro 10 ml Blut versetzt. Nach Abnahme wurde das Blut in einem Verhältnis von 1:2 mit PBS verdünnt und vorsichtig auf 15 ml Ficoll in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Anschließend erfolgte Zentrifugation für 25 Minuten bei 840 x g (2100 UpM), ohne aktivierte Bremse. Dadurch konnten drei Schichten erzeugt werden. Die oberste Schicht setzt sich aus Blutplasma zusammen, die mittlere aus Lymphozyten (farbloser opaker Ring, Interphase) und die unterste aus roten Blutkörperchen (Erythrozyten) und Granulozyten. Die Interphase wurde in ein frisches Röhrchen überführt und zweimal mit dem fünffachen Volumen an PBS gewaschen. Hierfür erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 540 x g mit eingeschalteter Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment durch Aufschütteln resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in RPMI III aufgenommen und gezählt.

##### **Isolierung von PBMC aus dem peripheren Blut von Patienten mit verschiedenen Leukämieerkrankungen**

Blutproben von Leukämie-Patienten wurden in heparinierten Abnahmeröhrchen von der KMT-Einheit der III. Medizinischen Klinik der LMU München bezogen. Ein Votum der zuständigen Ethikkommission zur Blutabnahmen von Leukämiepatienten, die an der III.Med.Klinik der LMU in Großhadern transplantiert wurden, liegt vor. Das Blut wurde mit 10 Teilen Erylyse-Puffer versetzt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 472 x g (1.500 UpM) zentrifugiert, der Überstand (Lysat der Erythrozyten) abgesaugt und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Bei einer verbleibenden Kontamination

## D. METHODEN

---

mit Erythrozyten wurde der Erylyse-Schritt wiederholt. Das Zellpellet wurde in PBS (0,5 mM EDTA) resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

### **Isolierung von PBMC aus peripheren Stammzell- (PBSC), CD6-Depletions- Präparaten und der CD6-positiven Fraktion**

Die aus der III. Medizinischen Klinik erhaltenen Proben der Stammzellpräparate aus den Spendern vor und nach CD6-Depletion (PBSC, CD6-depletierte PBSC) sowie die, sämtliche CD6-positive Zellen enthaltende, CD6-positive Fraktion (NTCB) wurden mit 1 zu 10 Teilen Erylyse-Puffer versetzt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 472 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Falls notwendig, wurde der Erylyse-Schritt wiederholt. Eine Isolierung der PBMC mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation konnte aufgrund der bei der CD6-Depletion verwendeten Puffer (Citrat, Plasma, ACDA Gerinnungshemmung, Zucker) nicht erfolgen. Nach erfolgreicher Erylyse wurden die Zellen in PBS (0,5 mM EDTA) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

### **Isolierung von Zellen aus Knochenmark**

Die Isolierung von Zellen aus Knochenmark erfolgte gemäß dem unter 2.2 beschriebenen Verfahren zur Isolierung von PBMC aus peripherem Blut von Patienten.

### **2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Aus einer Zellsuspension wurde ein Volumen von 50 µl steril entnommen, 1 + 1 mit Trypanblau gemischt, davon 10 µl in eine Neubauerzählkammer überführt und am Lichtmikroskop ausgezählt. Gezählt wurden nur die lebenden, d. h. die nicht mit Trypanblau gefärbten Zellen. Da häufig noch Erythrozyten in der Suspension vorlagen, wurden nur kernhaltige Zellen gezählt. Die Zellen wurden in einem Großquadrat (16 Kleinquadrate) ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Suspension ergibt sich aus der Formel: Zellzahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor x  $10^4$ .

### **2.4 Einfrieren von Zellen**

#### **2.4.1 Allgemeines Verfahren**

Die Zellen wurden für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Beim Einfrieren wurde DMSO zugesetzt, das die Bildung spitzer Eiskristalle beim Einfriervorgang

## D. METHODEN

---

verzögert oder verhindert, welche die Zellen mechanisch zerstören würden. Aufgrund der zelltoxischen Wirkung von DMSO auf stoffwechselaktive Zellen wurden alle Arbeitsschritte zügig und mit gekühlten Medien sowie vorgekühlten Einfrierröhrchen durchgeführt. Die abzentrifugierte Zellsuspension wurde in kaltem FBS resuspendiert und unter Schütteln langsam das gleiche Volumen des kalten Einfriermediums zugetropft (0,5 ml FBS pro 0,5 ml Einfriermedium pro Ampulle und  $2 \cdot 10^6$  Zellen). Die Röhrchen wurden zum Transport in eine Einfrierbox überführt, anschließend in Zellstoff verpackt (dies sorgt für eine langsame und schonende Absenkung der Temperatur) und mehrere Tage bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die endgültige Aufbewahrung wurden die Zellen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) in einem Stickstofftank eingelagert.

### **2.4.2 Verfahren für PBSC-, CD6-depletierte- und NTCB-Präparate**

Da sich diese Zellen durch die Leukapharese und anschließende Depletionsprozedur mehr als 24 h ex vivo befanden, bestand bei normaler Behandlung ein hohes Risiko zur Agglutination. Daher musste aufgrund der großen Menge an Zellen ein spezielles Einfrierverfahren für die genannten Präparate entwickelt werden. Dazu wurde das Einfriermedium (CD6-Einfriermedium) vorgemischt und auf  $4^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Die zuvor mechanisch vereinzelter Zellen wurden zügig in diesem Medium resuspendiert und in auf  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühlte Einfrierröhrchen gefüllt. Die restlichen Schritte erfolgten gemäß dem allgemeinen Verfahren (2.4.1).

## **2.5 Auftauen von Zellen**

### **2.5.1 Allgemeines Verfahren**

Die eingefrorenen Ampullen wurden auf Trockeneis ins Labor transportiert und anschließend in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad unter leichtem Schwenken angetaut. Die bis auf einen erbsengroßen Rest angetauten Zellsuspensionen wurden in RPMI III und FBS (50:50) aufgenommen und 5 Minuten bei  $472 \times g$  abzentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend mit 2 ml RPMI III gewaschen, erneut 8 Minuten bei  $472 \times g$  zentrifugiert und im jeweiligen Zellkulturmedium aufgenommen.

### **2.5.2 Verfahren für PBSC-, CD6-depletierte- und NTCB-Präparate**

Die Zellen wurden auf Trockeneis ins Labor transportiert und in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad unter vorsichtigem Schwenken angetaut. Anschließend wurde die angetaute

## D. METHODEN

---

Zellsuspension mit 1ml HBSS/MgCl<sub>2</sub> + 2000 U DNase versetzt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 8 Minuten bei 472 x g wurden die Zellen mechanisch vereinzelt und in 30 – 50 ml HBSS/MgCl<sub>2</sub> + Phenolrot aufgenommen. Das Phenolrot diente der Sichtbarmachung der Zellsuspension beim anschließenden Auftragen auf einen Ficoll-Dichtegradienten. Nach Zentrifugation für 25 Minuten bei 840 x g (ausgeschaltete Bremse) wurde die Interphase abgenommen und in 10 ml HBSS gewaschen (Zentrifugation für 20 Minuten bei 540 x g). Das Zellpellet wurde in HBSS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

### **2.6 Kultivierung adhärenter Zellen**

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in dem für den jeweiligen Zelltyp erforderlichen Medium in liegenden Kulturflaschen. Das Medienvolumen in kleinen Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> Adhärenzfläche, KKF) betrug 10-12 ml, in mittleren Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> Adhärenzfläche, MKF) 12-15 ml und in großen Kulturflaschen (125 cm<sup>2</sup> Adhärenzfläche, GKF) 20-25 ml. Transfizierte Zelllinien mit spezifischer Antibiotikumresistenz als Selektionsmarker wurden in entsprechendem Selektionsmedium kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde das Medium gewechselt oder die Zellen auf mehrere Kulturflaschen verteilt (gesplittet). Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Kulturflasche mit PBS gespült um letzte, trypsininhibierende FBS Reste zu beseitigen und 10 µl Trypsin-EDTA pro cm<sup>2</sup> Zellfläche zugegeben und für 1-2 Minuten bei RT oder im Fall schlecht ablösbarer Zellen bei 37°C inkubiert. Nach kräftigem Klopfen der Kulturflasche konnten die so abgelösten Zellen in dem entsprechenden Medium aufgenommen und auf zwei neue Kulturflaschen verteilt werden.

### **2.7 Kultivierung nicht-adhärenter Zellen**

Nicht-adhärente Zellen wurden je nach Zelldichte in liegenden kleinen, mittleren oder großen Kulturflaschen in den entsprechenden Medien kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde die Hälfte der Zellsuspension abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

### **2.8 Kultivierung von PBMC Zellen**

Die gemäß 2.2 isolierten PBMC wurden für funktionelle Versuche ÜN in Kulturflaschen (KKF, MKF oder GKF) in RPMI III + 10% HS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.9 Separation verschiedener Zellpopulationen

#### 2.9.1 Negative Isolation von NK Zellen

Die Separation der NK Zellen aus PBMC erfolgte mittels des negativen Isolationsverfahrens von Dynal. Diese Verfahren basiert auf der Aufreinigung einer gewünschten Zellpopulation durch Depletion der unerwünschten Zellpopulation. Hierfür enthält der Kit ein gegen Oberflächenmarker der unerwünschten Zellen (B-, T-Zellen, Monozyten und Granulozyten) gerichtetes Antikörpermisch sowie magnetische Kügelchen, die an die Antikörper binden. Für die Durchführung des Verfahrens wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS/0,1% FBS resuspendiert und 50  $\mu$ l Antikörpermisch zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 4 °C unter Rollen.

Nach Zugabe von 2 ml PBS/FBS wurde für 8 Minuten bei 472 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 25  $\mu$ l, zuvor dreimal mit PBS gewaschene, magnetische Kügelchen zugegeben und unter Rollen für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dem Rollen wurden die Kügelchen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und 2 Minuten dem Magnetfeld eines Festmagneten ausgesetzt. Die NK-Zellen enthaltende Negativfraktion wurde abgenommen und nochmals 25  $\mu$ l Kügelchen zugegeben, wie oben beschrieben inkubiert und erneut dem Magnetfeld ausgesetzt. Anschließend wurde die Zellzahl der Negativfraktion bestimmt und die Zellen in ein entsprechendes Medium überführt. Falls notwendig wurden vor der negativen NK-Isolation T-Zellen durch CD3-Depletion entfernt. Dafür wurden nach dem Auftauen 5 ml HBSS und 1 ml magnetische CD3-Mikrosphären (DynaBEads®CD3) zugegeben, anschließend 15 Minuten unter Rollen bei 4°C inkubiert, die Mikrosphären mittels Magnet entfernt und die Negativfraktion (CD3<sup>-</sup>) gewaschen.

#### 2.9.2 CD6-Depletion von NK Zellen

##### 2.9.2.1 Negative Isolation mit magnetischen Mikrosphären

Die Depletion CD6-positiver Zellen von zuvor, mittels Negativisolation isolierten NK Zellen erfolgte durch Zugabe von 5  $\mu$ l monoklonalem anti-CD6-Antikörper zu je  $1 \times 10^7$  Zellen, Rollen für 45 Minuten bei 4°C, Zugabe von 5 ml PBS/FBS und anschließender Zentrifugation für 8 Minuten bei 472 x g, Zugabe von 2ml PBS/FBS und  $10 \times 10^7$  magnetischen Kügelchen (Sheep-anti-Mouse IgG) und Inkubation für 15 Minuten bei 4°C unter Rollen. Nach dem Rollen wurden die Kügelchen vorsichtig resuspendiert und einem Magnetfeld ausgesetzt. Die



## D. METHODEN

---

Zellen der Negativfraktion und die Zellen der Positivfraktion (mit gebundenen Kügelchen) wurden anschließend in einer 24-Mulden-Platte in RPMI III + 10% HS bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> mit 300 U IL-2 bis zur weiteren Verwendung, jedoch mindestens einen Tag inkubiert.

### 2.9.2.2 CD6-Depletion nach Miltenyi

Zu  $10 \times 10^6$ -Zellen wurden 10 µl CD6 MicroBeads (Miltenyi, human CD6 MicroBeads, 130-091-264) gegeben und 30 Minuten bei 4°C gerollt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml Puffer (PBS + 0,037% EDTA + 0,5 % HSA) und Zentrifugation bei 472 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl Puffer resuspendiert und die Zellen auf einem AutoMACS™-Sorter (Automated Magnetic Cell Sorting Separator, Miltenyi Biotec Inc.) je nach Bindung an die MicroBeads sortiert. Die so erhaltene CD6<sup>+</sup>- und CD6<sup>-</sup>-Fraktion wurde in RPMI III + 15% FBS, 300U IL-2 aufgenommen und weiter verarbeitet.

## 3. Methoden der Molekularbiologie

### 3.1 Isolierung von RNS

Die RNS-Isolierung erfolgte aus lebenden Zellen. Es wurden mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen sedimentiert und 0,2 ml *Tri Reagent* pro  $1 \times 10^6$  Zellen zugegeben. Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 40 µl Chloroform pro 200 µl *Tri Reagent*, direkt anschließend wurde für 15 Sekunden gevortext und danach 2 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 Minuten mit 12000 x g bei 4 °C bildete sich eine obere, farblose, wässrige Phase, die RNS enthält sowie eine untere, rote, organische Phenolphase, in der Proteine sowie die Interphase-DNS enthalten sind. Die obere Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl Isopropanol pro 200 µl *Tri Reagent* gevortext und danach für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur zur Präzipitation stehengelassen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und die RNS als weißliches Sediment mit 500 µl Ethanol in DEPC Wasser durch vortexen und anschließende Zentrifugation für 8 Minuten bei 12000 x g und 4 °C gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes wurde das RNS-Sediment 3 Minuten ohne vollständiges Durchtrocknen des Sediments luftgetrocknet und anschließend in 20 µl DEPC Wasser durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach Inkubation für 10-15 Minuten bei 55 °C konnte mittels Spektralphotometer bei einer OD von 260 nm und einer Verdünnung von 1:50 - 1:200 der Gehalt an RNS bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt aufgrund der Absorption aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm. Das Verhältnis OD<sub>260</sub>/280 sollte zwischen 1,6 und 1,9 liegen, um eine ausreichende Reinheit in Bezug auf

## D. METHODEN

---

Proteine und Phenol sicherzustellen. Die RNS konnte nach Isolation bis zum Umschreiben in cDNS bei -20 °C aufbewahrt werden.

### 3.2 Reverse Transkription

Isolierte RNS wurde mittels reverser Transkription in cDNS umgeschrieben. Zunächst wurden dafür 1-5 µg der RNS mit 0,5 µg Oligo-dT Primern ad 12 µl DEPC Wasser für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Oligo-dT Primer binden hierbei an die Polyadenosin-Schwänze von mRNA (messenger-RNS), deren Tertiärstruktur durch die erhöhte Temperatur zerstört wurde, um die Bindung der Primer zu ermöglichen. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und mit einem Reaktionsgemisch aus 1 x 1<sup>st</sup> *strand buffer*, 10 mM DTT, 0,5 µM dNTP und 200 Einheiten (U) reverser Transkriptase Superscript II in einem Endvolumen von 8 µl versetzt. Dieser 20 µl-Ansatz wurde anschließend in einem PCR Gerät für 70 Minuten bei 42 °C inkubiert, wobei durch das Enzym die mRNA in cDNS umgeschrieben wurde. Während des nächsten Inkubationsschritts von 5 Minuten bei 90 °C erfolgte die Inaktivierung des Enzyms. Anschließend wurde die Reaktion durch Abkühlen auf 4 °C gestoppt. Die cDNS wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.3 Isolierung genomischer DNS

Die Isolierung genomischer DNS erfolgte aus PBMC der Normalspender und Patienten bzw. PBSC der Spender für die CD6-Transplantation mittels des QIAmp DNA Mini Kits nach Herstellerangaben. Prinzipiell basiert die Isolierung mittels des QIA DNA Mini Kits auf dem Aufschluß der Zellwände durch ein Detergenz, Abbau der Zellproteine durch eine Protease (Proteinase K), selektive Bindung von DNS aus dem Lysat an eine Membran, Waschen und Abzentrifugieren von Verunreinigungen auf Spinsäulchen. Der Elutionsschritt der zu isolierenden DNS erfolgte in PCR-Wasser.

Die isolierte genomische DNS wurde anschließend mittels Spektralphotometer auf ihren Nukleinsäuregehalt und mögliche Proteinverunreinigungen hin untersucht. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei 260nm. Die aufgereinigte genomische DNS wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.4 PCR

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) konnten spezifische Sequenzen der cDNS amplifiziert werden, um zu testen, ob diese in der Probe enthalten waren. Dies wurde mit spezifischen Primern für die zu untersuchende Sequenz, und in einem getrennten Ansatz mit

## D. METHODEN

für  $\beta$ -Actin-spezifischen Primern erreicht.  $\beta$ -Actin wird von jeder Zelle exprimiert (Positivkontrolle). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Wasser anstelle von cDNS.

### PCR-Ansatz:

1-2  $\mu$ l cDNS

1 x PreMix B Puffer (enthält u.a. dNTP,  $MgCl_2$ )

15 pM Primer *sense*

15 pM Primer *antisense*

2,5 U PreMix Enzym

ad 25  $\mu$ l Wasser

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	5 Minuten	94 °C	1
Amplifikation	30 Sekunden	94 °C	30-37
	30 Sekunden	60-65 °C	
	1 Minute	72 °C	
Endpolymerisation	10 Minuten	72 °C	1
Stop		4 °C	

Die Proben wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, siehe 3.5.

### 3.5 Gelelektrophorese

Die amplifizierte cDNS wurde über ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetrennt. Für ein Gel wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TAE Puffer gelöst, in einer Mikrowelle aufgeköcht und auf Handwärme abgekühlt. Anschließend wurden 4  $\mu$ l 1%iges Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und emittiert unter UV-Bestrahlung sichtbares Licht. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer gegossen und Luftblasen entfernt. Nach Polymerisation des Gels wurde der Laufpuffer (1 x TAE Puffer) in die Kammer mit Kämme für die Probentaschen gegossen und die Proben auf das Gel aufgetragen. Hierfür wurden jeweils 8  $\mu$ l Probe sowie ein Standard mit definierter DNS-Fragmentlänge (1kb DNS-Leiter) mit Auftragspuffer versetzt (Endkonzentration 1 x) und in die Probentaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Gleichspannung von 100 Volt, wobei die negativ geladene DNS in Richtung der Kathode läuft. Nach ausreichender Auftrennung der Proben wurde das Gel unter UV-Licht mit einer Digitalkamera aufgenommen.

## D. METHODEN

---

### 3.6 Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Agarosegel

Zur Elution bestimmter DNS-Fragmente aus dem Agarosegel wurde der QIAquick Gelelektaktionskit von Qiagen verwendet. Die Fragmente wurden hierfür aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Qiagen Reaktionsgefäß aufgereinigt. Das Prinzip basierte auf einer Bindung der DNS an eine Siliziumgel-Membran in den Reaktionsgefäßen. Die zugehörigen Puffer weisen spezifische Salzkonzentrationen und pH-Werte auf, welche die Bindung und anschließende Elution der DNS ermöglichen. Die Bindung erfolgte hierbei bei einer hohen Konzentration chaotropher Salze, welche die auf Wasserstoffbrückenbindungen basierende Struktur der DNS zerstören. Puffer QG löst die Agarose und ermöglicht die Bindung der DNS an die Membran. Puffer PE entfernt Salze, Primer, Ethidiumbromid, Enzyme und Detergenzien. Durch Puffer EB konnte die DNS anschließend eluiert werden. Das Kit eignet sich für DNS-Konstrukte von 70 bp bis 10 kb. Die Aufarbeitung wurde gemäß Herstellerprotokoll ausgeführt.

### 3.7 Klonierung von Nukleinsäuren in Vektoren

#### 3.7.1 Klonierung von ULBP4-syn

##### 3.7.1.1 ULBP4-syn

Für die Klonierung von ULBP4 wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Geneart AG (Regensburg) ein, an die *Codon Usage* von Homo sapiens angepasstes, synthetisches Gen zur verbesserten Expression in humanen Zellen erzeugt. Das ursprünglich aus der HaCat-Zelllinie mittels PCR und den Primern ULBP4 isolierte ULBP4-Wildtypgen zeigte im Kodon für die Aminosäureposition 82 einen nichtkonservativen Aminosäureaustausch (Tyrosin gegen Asparagin) im Vergleich zur PubMed ULBP4-Sequenz. Auf die Durchführung einer gerichteten Punktmutation zur Rückmutation an AA-Position 82 wurde zugunsten der Erzeugung eines synthetischen Gens mit angepasster *Codon Usage* verzichtet. Daneben ermöglichte das synthetische Gen die Einführung zweier endständiger Restriktionsschnittstellen und dadurch eine vereinfachte Umklonierung.

Bei ULBP4syn handelt es sich um ein 816 Nukleotide langes Gen, dessen Aminosäuresequenz der des ULBP4-Wildtypgens entspricht, und das mit einer 5' *BamHI*- und einer 3' *XhoI*-Restriktionsschnittstelle ausgestattet ist. ULBP4syn wurde als Ligationsprodukt in dem 3670 bp großen Vektor pPCR-Script von der Firma Geneart AG bezogen (pPCR-Script-ULBP4syn). Zur Vervielfältigung des Vektors wurden DH5 $\alpha$ -T1<sup>R</sup> One

## D. METHODEN

---

Shot E.coli-Bakterien transformiert. Die komplette Nukleotidsequenz von ULBP4syn ist im Anhang Abbildung I.2 aufgeführt.

### 3.7.1.2 Transformation

Für das Ausplattieren der transformierten Bakterien wurden Agar-Platten gegossen. Hierzu wurden 10 g LB in 500 ml dest. Wasser im Erlenmeyerkolben gelöst und 7,5 g Agar zugegeben. Dieser wurde anschließend autoklaviert und nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C mit Ampicillin versetzt (0,1 mg/ml). Anschließend wurden die Petrischalen mit 25 ml flüssigem Agar befüllt und zum Aushärten unter dem Abzug stehengelassen. 5 µl des Ligationsansatzes wurden mit kompetenten *One Shot* Bakterien 30 Minuten auf Eis inkubiert, 30 Sekunden bei 42 °C erhitzt, 2 Minuten auf Eis gegeben und anschließend in 250 µl S.O.C. Medium aufgenommen. Dieser Ansatz wurde 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt und danach auf, mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml) beschichteten Ampicillin-Platten, ausplattiert.

### 3.7.1.3 Selektion positiver Klone

Die Selektion auf positive Klone erfolgte durch den Blau/Weiß-Test. Der Test beruht darauf, dass Insertionen in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors die Bildung von, auf dem Vektor kodierter  $\beta$ -Galaktosidase verhindern.  $\beta$ -Galaktosidase spaltet neben dem Substrat Laktose auch 5-Brom-4-Chlor-indoyl- $\beta$ -D-Galaktosid (X-Gal). Dabei entsteht der Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-indigo, der sich in Anwesenheit von Sauerstoff blau verfärbt. Im X-Gal Test werden Bakterien eingesetzt, die durch Deletion im Chromosom nur eine inaktive  $\beta$ -Galaktosidase ohne N-Terminus bilden können. Dieser Effekt wird durch Plasmide, die das *lac* POZ'-Operon tragen (Promotor, Operator, 5'-Ende des *lacZ'*-Gens) kompensiert. Das hiervon kodierte  $\alpha$ -Peptid kann die inaktive  $\beta$ -Galaktosidase zum aktiven Enzym komplementieren ( $\alpha$ -Komplementation). Da die Multiklonierungsstelle des Vektors innerhalb des *lacZ*-Gens liegt, wird die Bildung des  $\alpha$ -Peptides verhindert, wenn die Insertion erfolgreich war und die Kolonien bleiben weiß. Klone ohne Insert zeigen dagegen eine Blaufärbung. Es wurden Kolonien ausgewählt, die weiß und in der Mitte blau waren, da komplette Weißfärbung meist bedeutet, dass das Insert mutiert ist. Die unvollständige Weißfärbung erklärt sich daraus, dass das sehr kleine Insert das Lesen des *lacZ*-Gens nicht verhinderte. Da die bei der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterien weder das  $\lambda^Q$ -Allel noch der Vektor das *lacI*-Gen für den Repressor des *lacZ*-Gens exprimierten, war es nicht nötig IPTG als Inaktivator des Repressors einzusetzen.

## D. METHODEN

---

Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden 6 positive Kolonien von der Platte gepickt und in 6 ml LB-Medium mit 0,6 mg Ampicillin über Nacht, im 15 ml Zentrifugationsröhrchen, bei 37 °C geschüttelt. Gleichzeitig wurde für jede gepickte Kolonie eine Kolonie-PCR mit ULBP4syn-Primern durchgeführt.

### 3.7.1.4 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wird ein Teil der durch das Blau-Weiß-Screening ausgewählten Kolonie direkt mittels eines sterilen Zahnstochers in einen vorbereiteten PCR-Ansatz überführt.

#### PCR-Ansatz:

2 µl 10x Puffer

1 µl dNTPs

1 µl 5' ULBP4syn Primer

1 µl 3' ULBP4syn Primer

0,2 µl Taq-Polymerase

13,8 µl H<sub>2</sub>O

Nach der PCR-Reaktion wurden jeweils 15 µl Probe zusammen mit Probenpuffer sowie ein Standard auf ein 1,5% Agarosegel (1% EtBr) aufgetragen. Positive Kolonien wurden nach Anwachsen ÜN in LB-Medium (0,6 mg/ml Ampicillin) einer Minipräparation zugeführt, um die vervielfältigten Vektoren zu isolieren.

### 3.7.1.5 Minipräparation

Die Minipräparation mit dem Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien und anschließender Adsorption der DNS an Silizium in Anwesenheit einer hohen Konzentration von Salzen. Es können bis zu 20 µg Plasmid-DNS mit hoher Kopienzahl gewonnen werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Anschließend wurde die Konzentration des aufgereinigten Vektors mittels Spektrometer bei 260 nm bestimmt. Der ULBP4syn enthaltende pPCR-Script-ULBP4syn Vektor wurde mit einer Konzentration von 0,204 µg/µl isoliert und anschließend das synthetische ULBP4 Gen per Restriktionsendonukleaseverdau ausgeschnitten und in den Vektor pcDNA3.1(+) kloniert.

## D. METHODEN

### 3.7.2 Klonierung in den pcDNA3.1(+) Vektor

#### 3.7.2.1 Vektorkarte pcDNA3.1(+/-)

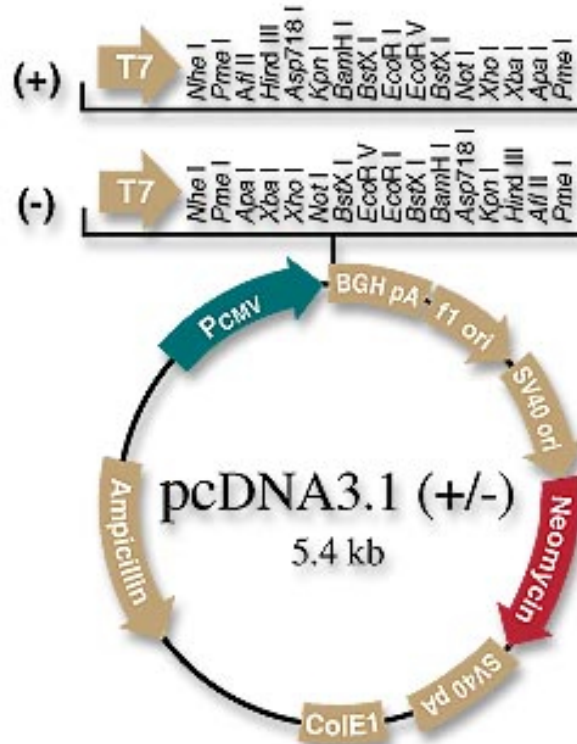


Abbildung D2: pcDNA3.1-Vektorkarte (Copyright Invitrogen Corporation)

#### 3.7.2.2 Vektorkarte pPCR-Script

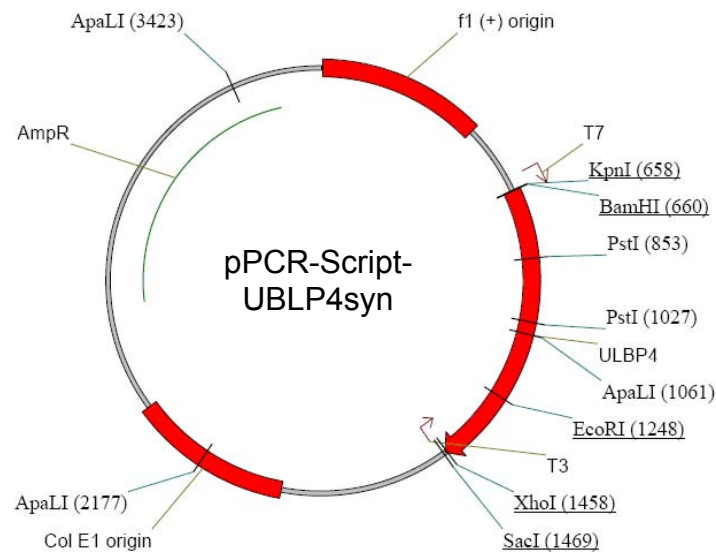


Abbildung D3: pPCR-Script-ULBP4syn-Vektorkarte

## D. METHODEN

---

Mit dem folgenden Enzym-Verdau wurde das Insert (ULBP4syn) aus dem pPCR-Script-Vektor geschnitten und der pcDNA3.1(+) Leervektor linearisiert.

### 3.7.2.3 *XhoI* und *BamHI*-Verdau

Ansatz für pPCR-Script-ULBP4syn und pcDNA3.1(+)

15 µl Vektor (= 3µg)

2,5 µl Puffer B

1,5 µl *XhoI* (15U)

1,5 µl *BamHI* (15U)

4,5 µl H<sub>2</sub>O

Zur Entfernung der Restriktionsendonukleasen, Kontrolle des Verdau und Umpufferung wurden die Ansätze anschließend auf ein präparatives 1% Agarosegel (1% EtBr) aufgetragen, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraktions-Kit gemäß Herstellerangaben aufgereinigt (Elutionsvolumen = 50 µl). Vor der anschließenden Ligation des ausgeschnittenen ULBP4syn-Gens und des linearisierten pcDNA3.1(+) Vektors wurde jeweils die Konzentration per Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt.

### 3.7.2.4 Ligation

Die Ligation erfolgte nach Waschen in DNS-Verdünnungspuffer in einem Gewichtsverhältnis von Vektor zu Insert von 1:2 in einem Volumen von 25 µl.

5 µl Insert (0,5x Vektor Menge)

1 µl pcDNA3.1(+) linearisiert

4 µl Verdünnungspuffer (10x)

2 µl T4-Ligasepuffer (2x)

0,5 µl T4 DNS-Ligase

12,5 µl Wasser

Dieses Ligationsgemisch wurde 1 Stunde bei 22°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Insert mitgeführt. Nach Inkubation erfolgte die Inaktivierung der T4-DNS-Ligase für 20 Minuten bei 65°C. Transformation, Kolonie-PCR, Minipräparation und Kurzverdau wurden wie unter 3.7.1 beschrieben durchgeführt. Bei positiver Kolonie-PCR wurden eine Minipräparation sowie ein Kurzverdau angesetzt. Nach PCR-Analyse eines putativ positiven Ligationsergebnisses mit den ULBP4syn-Primern wurde die entsprechende Bande nach Auftrennung auf einem Agarosegel ausgeschnitten und zur Sequenzierung verschickt.



### 3.7.3 Sicherheitsbestimmungen

Alle gentechnischen Arbeiten wurden im Rahmen des Gentechnikgesetzes (GenTG) vom 01.07.1990 (letzte Änderung 17.03.2006) gemäß den Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen nach §7 Abs. 1, GenTG durchgeführt. Arbeiten mit gentechnisch veränderten *Escherichia coli* Bakterien wurden im S1-Sicherheitslabor durchgeführt (Projektleiter Dr. Christine S. Falk). Abfälle gentechnisch veränderter Organismen wurden autoklaviert.

### 3.8 HLA-C Typisierung mittels LABType™ SSO

Bei der HLA-C Typisierung mittels LABType™ SSO handelt es sich um ein so genanntes reverses SSO (rSSO) DNS-Typisierungsverfahren, wobei sequenzspezifische Oligonukleotidsonden (SSO) zur Anwendung kommen, die an farbkodierte Polymerkügelchen (Mikrosphären) gebunden sind. Dadurch wird die Bestimmung von HLA-Allelen ermöglicht, die zu den Sonden komplementär sind. Die zu untersuchende genomische DNS wird dazu durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen, biotinylierten Primern amplifiziert. Bei der LABType™ SSO HLA-C Typisierung werden Exon2 und Exon3 des HLA-C Gens gleichzeitig amplifiziert.

Nach Denaturierung und Neutralisation können die biotinylierten PCR-Produkte (Exon 2 und 3) mit sequenzkomplementären Oligonukleotidsonden, die an farbkodierte Mikrosphären gebunden sind, hybridisieren. Danach werden nicht hybridisierte Amplikons durch stringentes Waschen entfernt. Nach dem Waschen wird die hybridisierte DNS aus der Probe mit R-Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin (SAPE), das an die biotinylierten Primerenden bindet, markiert, wobei die Fluoreszenzintensität ein Maß für die Hybridisierung darstellt. Die Messung erfolgt an einem Durchflussanalysegerät (LABScan™100).

#### **PCR-Ansatz für HLA-C Typisierung:**

13,8 µl D-Mix

4 µl                    Amplifikations-Primer Mischung

0,2 µl                Taq-Polymerase

2 µl                  DNS

## D. METHODEN

---

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Schritt 1:	3 Minuten	96°C	1
Schritt 2:	20 Sekunden	96°C	5
	20 Sekunden	60°C	
	20 Sekunden	72°C	
Schritt 3:	10 Sekunden	96°C	30
	15 Sekunden	60°C	
	20 Sekunden	72°C	
Schritt 4:	10 Minuten	72°C	1
Schritt 5:	Pause	4°C	1

Nach Beendigung der PCR wurden zur Überprüfung je 5 µl der Proben sowie ein Längenstandard (1kb Leiter) zusammen mit Auftragspuffer auf ein 1,5% Agarosegel (1% EtBr) aufgetragen und das Gel photographisch dokumentiert. Die PCR-Produkte konnten bis zur weiteren Verarbeitung einen Monat bei –20°C gelagert werden.

Für die weitere Probenvorbereitung wurden jeweils 5 µl der amplifizierten DNS-Probe in die Vertiefung einer 96-Well-MTP-Platte oder wahlweise in dünnwandige 0,2ml PCR-Streifenröhrchen gegeben und die Position und Identität der Probe vermerkt. Anschließend wurden jeweils 2,5 µl Denaturierungspuffer zugegeben, gut gemischt und bei Raumtemperatur (25°C) 10 Minuten inkubiert. Danach wurden jeweils 5 µl Neutralisierungspuffer zugeführt, wobei ein Farbumschlag von violett nach blassgelb zu beobachten war. Sämtliche weiteren Schritte erfolgten auf Eis.

Für die Hybridisierung wurden je 4 µl Mikrosphärenmischung (Bead-Mischung) zusammen mit 34 µl Hybridisierungspuffer zugegeben und nach Versiegelung des Röhrchens bzw. der Platte gut mittels Vortex gemischt. Die 96-Well-MTP-Platte wurde anschließend zur Hybridisierung für 15 Minuten in einen auf 60°C vorgeheizten PCR-Block gestellt. Nach Hybridisierung wurde sofort mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen und bei 840 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Waschschrift noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden je 50 µl 1x SAPE-Lösung (0,5 µl 100 x SAPE in 49,5 µl SAPE-Puffer) zu der Probe gegeben und 5 Minuten bei 60°C im PCR-Block inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (100 µl Waschpuffer) wurde die Probe vorsichtig in 70 µl Waschpuffer resuspendiert, in eine 96-Well TC-Platte mit V-Boden überführt, und bis zur Messung unter Lichtausschluss bei 4°C maximal 24 h gelagert. Kurz vor der Messung wurden die Proben erneut kurz aufgeschüttelt. Die Messung erfolgte am LABScan™100 mit

## D. METHODEN

---

der Software Luminex 100 IS 2.3 von OneLambda. Die Dateien wurden als „output“-Files exportiert und in die Software HLA-Visual (Version 1.1.1) geladen und dort ausgewertet.

### 3.9 KIR SSO Genotypisierung

Die KIR SSO Typisierung der insgesamt 16 KIR-Gene erfolgte analog der HLA-C Typisierung, mit Ausnahme davon, dass wegen der großen Zahl der Gene für die Amplifizierung der DNS drei getrennte PCR-Ansätze benötigt wurden, da die Exons 3 (Gruppe 1), 5 (Gruppe 2) und 7-9 (Gruppe 3) nicht gleichzeitig amplifiziert werden können. Die hohe Homologie der KIR-Gene ermöglicht es, generische Primer für die genannten drei Exons zu definieren, die alle 16 Gene in diesen Exons amplifizieren können. Es wurden dieselben PCR-Bedingungen und Probenaufbereitungsschritte wie bei der HLA-C Typisierung durchgeführt. Am Ende wurden für jede DNS-Probe drei Ansätze am Durchflussanalysegerät gemessen (Gruppe 1, 2, 3) und die Daten von der Auswertesoftware (HLA-Visual, Version 1.1.1) automatisch zusammengeführt.

### 3.10 Auswertung der Typisierungsdaten

Zur Auswertung und genauen Bestimmung des HLA-C oder KIR Genotyps wurden die gemessenen Daten in die Auswertesoftware HLA-Visual importiert. Die Messsoftware Luminex 100 IS 2.3 speichert die Fluoreszenzintensität (FI) jeder Mikrosphäre. Der Prozentsatz eines Positiv-Werts berechnet sich durch die Formel:

$$\% \text{ Positiv-Wert} = 100 \times \frac{\text{FI (Probe n)} - \text{FI (Probe Negativkontrolle)}}{\text{FI (Probe Positivkontrolle)} - \text{FI (Probe Negativkontrolle)}}$$

Eine positive Hybridisierung wird als Prozent der Positiv-Werte einer Probe definiert, die über einem festgelegten Grenzwert der Qualitäts-Kontrolle für die Probe liegen. Entsprechend wird eine Negativreaktion (keine Hybridisierung) als Prozent der Positiv-Werte definiert, die unterhalb dieses festgelegten Grenzwertes liegen. Der Grenzwert ist für jede Mikrosphäre definiert und wird von der Software HLA-Visual vorgegeben.

Bei der Auswertung war darauf zu achten, dass die gemessenen Positivkontrollen nicht unterhalb des festgelegten Grenzwertes liegen und darüber hinaus keine Hybridisierung bei den Negativkontrollen zu beobachten ist. Die Mikrosphären (insgesamt 78 bei der HLA-C Typisierung und 46 bei der KIR Typisierung) wurden einzeln daraufhin überprüft, ob sie tatsächlich ober- oder gegebenenfalls unterhalb des für die jeweilige Mikrosphäre festgelegten Grenzwerts lagen. Die Zuteilung einer Probe in eine spezifische Allelgruppe

## D. METHODEN

---

eines Locus wurde durch ein spezifisches Muster aus positiven Hybridisierungsereignisse bestimmt. Beispielhaft würde die Kombination aus einer positiven Hybridisierung der Beads 4, 6, 7, 15, 22, 27, 30, 47, 60 und 74 dem HLA-C Cw\*0108 Allel entsprechen. Die Software schlägt einen HLA-C-Genotyp für jede Probe vor. Anschließend kann das serologische Äquivalent angezeigt werden, dass Aufschluß über die an Position 80 der Aminosäuresequenz vorliegende Aminosäure und damit für die Einteilung in die HLA-C-Gruppen gibt. Es kann sich hierbei um Asparagin oder Lysin handeln, wodurch eine Einteilung der Probe in zwei verschiedene HLA-C-Gruppen möglich ist. Die Proben wurden nach den HLA-C-Gruppen C1 (Asparagin an Position 80) bzw. Gruppe C2 (Lysin an Position 80) eingeteilt. So konnte für jeden Spender/Patienten bestimmt werden, ob dieser homozygot in Bezug auf Gruppe C1 bzw. C2 oder heterozygoten (C1/C2) ist. Zur Gruppe C1 gehören die HLA-C Allele Cw1, 3, 7, 8, 12, die Allele Cw 2, 4, 5, 6, 15, gehören zur Gruppe C2.

Die Auswertung der Daten der KIR-Typisierung erfolgte entsprechend der Auswertung der HLA-Typisierungsdaten, wobei die An- bzw. Abwesenheit der 16 KIR-Gene sowie einige allelische Varianten angegeben werden. Es wurde auf das Vorliegen der sogenannten Rahmen-Loci geachtet (2DL4, 3DP1, 3DL2 und 3DL3), die in allen bekannten KIR-Haplotypen vorhanden sind. Die Proben wurden anschließend nach den beiden Haplotypen A bzw. B aufgrund des Vorliegens der Gene für aktivierende KIRs eingeteilt. Der Haplotyp A besitzt 7 Loci; 2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2 und 3DL3, der Haplotyp B weist verschiedene Kombinationen von 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1 und 2DS4 auf. Haplotyp A unterscheidet sich also von Haplotyp B durch das Vorliegen von maximal einem aktivierenden KIR Gen, wobei Haplotyp B mehr als ein aktivierendes Gen aufweist. Darüber hinaus hat das KIR2DS4-Gen ein Null-Allel mit einer Frequenz von 84% in der Bevölkerung (Allelfrequenz von 60%), wodurch Individuen homozygot für den Haplotyp A sind und keinen aktivierenden KIR exprimieren.

Die einzelnen Spender bzw. Patienten wurden durch die KIR-Typisierung in folgende Gruppen eingeteilt.

### **Haplotyp**

A/A homozygot

A/B heterozygot

B/B homozygot

Wobei weiterhin zwischen AD (A Deletion, d.h. Vorliegen eines 2DS4 Null-Allels wie 003, 002, 004, 006) und Awt unterschieden wurde (vorliegen des 2DS4 001 Alleles). Darüber

## D. METHODEN

---

hinaus kann im Fall von Haplotyp B nur 2DS1 oder 2DS4 vorliegen. Für die statistische Auswertung wurden die Anzahl an aktivierenden KIR-Genen berechnet.

### 4. Methoden der Biochemie

#### 4.1 Bioplex-Verfahren

Das Bio-Plex-Verfahren erlaubt die simultane Messung mehrerer Zytokine und Chemokine im Überstand einer Zellsuspension. Das System basiert auf Antikörpern, die an Mikrosphären mit jeweils unterschiedlicher eigener Fluoreszenz gebunden sind und spezifisch bestimmte Zytokine/Chemokine erkennen. In einem weiteren Schritt bindet ein Biotin-markierter Antikörper an ein anderes Epitop des Zytokins/Chemokins, wobei dieser Antikörper wiederum über PE-gekoppeltes Streptavidin nachgewiesen werden kann. Hierdurch kann die Photozelle im Gerät durch die erste Fluoreszenz der Kügelchen, die Art des Zytokins/Chemokins, und durch die Intensität der zweiten Fluoreszenz des PE, die Menge des vorhandenen Zytokins/Chemokins ermitteln. Im Reagenziensystem enthaltene Standardkonzentrationen jedes Zytokins/Chemokins ermöglichen die absolute Quantifizierung über Standardkurven.

#### Durchführung

Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

Der lyophilisierte Zytokinstandard wurde in 50 µl Wasser resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe des Standards von 32000; 16000; 8000; 2000; 500; 125; 31,5; 7,8 pg/ml in RPMI III hergestellt. Hierfür wurden 25,6 µl Standard mit 374,4 µl Medium verdünnt und je 200 bzw. 100 µl in 200 bzw. 300 µl vorgelegtes Medium titriert. Die benötigten Löcher einer 96-Loch-Bio-Plex MCV-Platte wurden mit je 100 µl Assay *Diluent A* gewaschen, die restlichen Löcher mit Folie abgeklebt. Dazu wurde die Flüssigkeit mit einem Vakuum-Absaugegerät durch die Filter am Plattenboden abgesaugt. Anschließend wurden die gut gevortexten Mikrosphären (2 µl pro Mikrosphäre pro Kit und Loch, in Assay *Buffer A* verdünnt) in einem Volumen von je 50 µl in den Löchern vorgelegt und die Platte zweimal mit 100 µl *Wash Buffer A* gewaschen. Danach wurden 50 µl der Standardverdünnungen sowie der Zellüberstände aufgetragen. Als Negativkontrolle wurden Proben der Zellkulturmedien mitgeführt. Für die Inkubation wurde die Platte abgeklebt, mit Alufolie umwickelt und für 30 Sekunden bei 1100 UpM und anschließend für 60 Minuten bei 300 UpM und RT geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Platte dreimal mit *Wash Buffer A* gewaschen und abgesaugt. Kurz vor dem Auftragen wurden die Detektionsantikörper gemischt und je nach Konzentration des Antikörpers 1:50 oder 1:100 in

## D. METHODEN

---

*Ab-Diluent* verdünnt. Danach wurden 25 µl der Mischung aus den Detektionsantikörpern pro Loch zugegeben und wie oben beschrieben inkubiert. Nach Waschen wurden die Streptavidin-PE-Moleküle 1:100 in *Ab-Diluent* verdünnt und in einem Volumen von 50 µl pro Loch zugegeben. Die Platten wurden für 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend gewaschen. Zuletzt wurden je 125 µl *Assay Buffer A* auf die Proben gegeben und die Platten bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Messung wurden die Platten nochmals 30 Sekunden bei 1100 UpM aufgeschüttelt. Das Bio-Plex Gerät musste vor jeder Messung mit beigefügten Kalibrierungsmikrosphären kalibriert werden. Die Messung erfolgte automatisiert. Die Proben wurden jeweils als Duplikate mitgeführt.

### Auswertung

Die einzelnen Standardkurven der verschiedenen Zytokine/Chemokine wurden von der Software automatisch berechnet. Anhand dieser Standardkurven konnte die jeweilige Zytokin- oder Chemokin-Konzentration in der Probe berechnet werden. Die genaue Durchführung des Protokolls und der Messung finden sich in der Herstelleranleitung.

### 4.2 Phosphoprotein-Bestimmung

Das Verfahren zur Bestimmung von Phosphoproteinen basiert auf der Multiplex-Technologie und erlaubt den gleichzeitigen Nachweis von bis zu 100 verschiedenen phosphorylierten Proteinen in einer einzelnen Probe. Derzeit sind Assays für 26 unterschiedliche Phosphoproteine erhältlich. Beim diesem Verfahren wird der Gesamtgehalt an phosphoryliertem Protein (*Total-Target*) und in einem getrennten Ansatz die Menge eines spezifischen Phosphoproteins bestimmt.

### Durchführung

Zur Herstellung der Proteinlysate wurden die NK-Zelllinien NKL, NK92, YT und B.3NK sowie die T-Zelllinie Jurkat in ihrem jeweiligen Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur genommen und bis zu einer Zellzahl von mindestens 10x10<sup>6</sup> kultiviert. Die Zellen wurden anschließend 24h vor Beginn der Stimulierung mit PMA/Ionomycin in ein Basalmedium (RPMI III + 0,5% FBS) überführt, um die Hintergrundphosphorylierung abzusenken. Die Zellen wurden danach in RPMI III gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Die Menge an Zellen für die jeweiligen Ansätze wurde auf 2x10<sup>6</sup> eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in RPMI III + 0,5% FBS mit 1 ng/ml PMA und 250 ng Ionomycin (pro 2x10<sup>6</sup> Zellen) bzw. 500 U/ml IFN-α bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und die Stimulation zu vorher festgelegten Zeitpunkten (0, 15, 30,

## D. METHODEN

---

45, 60 Minuten) durch Zugabe des doppeltem Volumens von eiskaltem PBS und anschließender Zentrifugation (5 Minuten, 472 x g) gestoppt. Die Zellen wurden danach erneut mit eiskaltem PBS gewaschen und abzentrifugiert (5 Minuten, 472 x g). Die Lyse erfolgte nach Waschen mit 200 µl *Cell-Wash-Puffer* (Bio-Plex Cell Lysis Kit), Zentrifugation (8 Minuten, 2000 UpM) durch Zugabe von 100 µl Lysepuffer + 2 µl Faktor 1 und 1 µl Faktor 2 (Bio-Plex Cell Lysis Kit) sowie 2 µl PMSF und Rollen für 30 Minuten bei 4°C. Anschließend wurden die Proben auf Trockeneis gestellt und auf Nasseis wieder aufgetaut. Dieser Schritt führte zu einer erhöhten Proteinausbeute. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 4.500 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration durch einen BCA-Test gemäß Herstellerangaben bestimmt. Die Lysate konnten anschließend für mehrere Tage bei –80°C gelagert werden. Vor der Vorbereitung für die Messung wurden die Lysate mit einer 1:1 Mischung aus Lyse-Puffer und Assay-Puffer auf eine Endkonzentration von 0,2 µg/µl gebracht. Jeweils 1,25 µl der Mikrosphären (50x) der einzelnen Singleplex-Assays wurden zusammen mit jeweils 50 µl Assaypuffer pro Singleplex-Assay für die Anzahl der benötigten Proben vorbereitet und gevortext. Anschließend wurden je 50 µl dieser Mikrosphärenmischung in die Löcher einer zuvor mit Waschpuffer gewaschenen und benetzten 96-Loch-Filterplatte gefüllt, durch Vakuumfiltration vom Assaypuffer befreit und zweimal gewaschen. Anschließend werden 62,5 µl des jeweiligen Lysats zu der Mikrosphärenmischung gegeben. Für die *Total-Target* Ansätze (Gesamtgehalt an phosphoryliertem Protein) wurde entsprechend vorgegangen. Die Ansätze wurden anschließend ÜN bei RT inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Mischung der Detektionsantikörper in *Detection-antibody-diluent* (Bio-Plex Phosphoprotein Assay Kit) angesetzt. Dazu wurden pro Ansatz je 1,25 µl Antikörper des jeweiligen Singleplex-Assays zusammen mit jeweils 25 µl *Detection-antibody-diluent* vermischt. Die ÜN inkubierten Proben wurden vakuumfiltriert und dreimal gewaschen. Zu jedem Filterloch der 96-Loch-Platte wurden 25 µl der Antikörpermischung gegeben und 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen und gleichzeitig die benötigte Menge an Streptavidin-PE-Lösung aus 100x Streptavidin (SAPE) und SA-PE Puffer angesetzt. Zu jeder Probe wurden dann 50 µl SAPE-Lösung gegeben und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Vakuumfiltration wurde dreimal mit Rinse-Puffer gespült und anschließend je 125 µl Resuspensionspuffer zugegeben und 30 Sekunden bei RT inkubiert. Kurz vor der Messung wurden die Proben noch einmal kurz aufgeschüttelt.

### Messung und Auswertung

Die Messung der Proben erfolgte am Bio-Plex Gerät (LABScan™100) unter „High Calibration“ Bedingungen nach Kalibrierung mit Bio-Plex Kalibrierungsmikrosphären mit der

## D. METHODEN

---

Bioplex-Software. Für jede Probe wurden Duplikate gemessen. Als Positivkontrolle dienten Bio-Plex Assay Lysate (EGF behandelte HEK293 für Akt, ERK1/2; ERK2, GSK-3a/b; IFN- $\alpha$  behandelte HeLa für STAT3; TNF- $\alpha$  behandelte HeLa für I $\kappa$ B- $\alpha$  und UV behandelte HEK293 für JNK, p38 MAPK und ATF-2). Die Ansätze der bzgl. der Phosphoproteine untersuchten Zelllinien und dazugehörigen *Total-Targets* wurden vor der Messung per Software gruppiert und auf eine Referenz bezogen (Kinetikzeitpunkt 0 Minuten), damit die Zunahme an Phosphoprotein im Verhältnis zum Hintergrund bestimmt werden konnte.

### 4.3 Westernblot

Gleichzeitig mit der Bestimmung der Phosphoproteine der stimulierten NK- und T-Zelllinien wurden diese auch durch Westernblotanalyse nachgewiesen.

Jeweils 50  $\mu$ g Protein der Ansätze sowie ein Größenstandard wurde auf ein 10% SDS-Gel mit Sammel- und Trenngel aufgetragen und aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine zuvor mit Methanol benetzte und mit Transferpuffer gewaschene 0,45  $\mu$ m PVDF-Membran bei 110V für 1 Stunde geblottet. Der Blot wurde mit Ponceau-Rot gefärbt, der Größenstandard mit Kugelschreiber nachgezeichnet und die Membran mit H<sub>2</sub>O entfärbt. Der Blot wurde danach ÜN mit Ge-Not Blockierungslösung geblockt. Am nächsten Tag wurde die Blockierungslösung abgegossen und der Blot ÜN bei 4°C mit 1/1000 Primärantikörper gerollt (3  $\mu$ l in 3 ml Blockierungslösung). Anschließend wurde dreimal mit TBST-Puffer gewaschen und 45 Minuten bei RT mit 1/3000 Sekundärantikörper in Blockierungslösung gerollt. Danach wurde dreimal mit TBST-Puffer und einmal mit PBS gewaschen und der Blot für das Auflegen auf den Film mit je 2ml der Reaktionsmischung des ECL-Kits (*enhanced chemiluminescence*) 1 Minute bei RT inkubiert.

Überschüssige Reaktionsmischung wurde auf Zellstoff abgetupft und der Blot in einer Autoradiographiekassette auf einen Autoradiographiefilm gelegt. Die Belichtungszeit des Films betrug 5 Minuten. Anschließend wurde der Blot mit Stripping-Solution für 1h bei 55°C gestrippt. Nach dem Strippen wurde dreimal mit TBST gewaschen und anschließend ÜN mit 7% Milchpulver in TBST erneut blockiert. Danach wurde der jeweilige Antikörper gegen *Total-Target* 1/1000 in 1% Milchpulver TBST auf die Membran gegeben und 1h bei 4°C unter Rollen inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit TBST und anschließend Zugabe von 1/3000 Sekundärantikörper (Goat-anti-Rabbit) in 1% Milchpulver TBST und Inkubation für 1h bei RT unter Rollen. Danach erfolgten 3 Waschschrte mit TBST und einmaliges Waschen mit PBS. Die ECL-Reaktionsmischung wurde wie oben beschrieben aufgebracht und der Blot auf einen Autoradiographiefilm für 3-5 Minuten aufgelegt.



### 5. Durchflußzytometrie

#### 5.1 Allgemein

Die Durchflußzytometrie am *fluorescence activated cell sorter* (FACS) ermöglicht eine Analyse der Expression bestimmter Zellmoleküle über Fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper. Diese Antikörper sind spezifisch für Proteine auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren. Der FACSCalibur ist mit zwei Lasern ausgestattet (488 nm Argon und 633 nm He/Ne), die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe anregen können. Diese emittieren nach Anregung Licht spezifischer Wellenlänge, das von Photozellen (Photomultipliern) im FACS qualitativ und quantitativ gemessen wird. Dadurch kann die Art der Markierung (Expression eines spezifischen Moleküls) und deren Intensität (Expressionsstärke des spezifischen Moleküls) auf einzelnen Zelle bestimmt werden. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC-H) ermöglicht zusätzlich eine Aussage über die Größe, das Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC-H) über die Granularität der Zelle. Somit ist es möglich die Zellen nach Größe, Granularität und Expression bestimmter Moleküle einzuteilen. Monoklonale Antikörper, die für FACS Analysen verwendet wurden, waren mit FITC (Fluorescein-Isothiocyana, FL-1, Emissionsmaximum bei 530 nm), PE (Phycoerythrin, FL-2, Emissionsmaximum bei 585 nm), PC5/PerCP (FL-3, Emissionsmaximum bei 660-680 nm), CyChrome (FL-3, Emissionsmaximum bei 675 nm) oder APC (Allophycocyanin, FL-4, Emissionsmaximum bei 767 nm) markiert.

#### 5.2 Direkte Färbungen

Die zu messenden Zellen wurden abzentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen. Pro Ansatz wurden 50 µl der Zellsuspension mit jeweils 2 µl direkt-markierten Antikörper für 15 - 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Pro Ansatz wurden zwischen 50.000 und 2.000.000 Zellen eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer für 5 Minuten bei 540 x g gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die markierten Zellen entweder in 100-150 µl FACS-Puffer aufgenommen und sofort gemessen, oder mit 100-150 µl 1% PFA fixiert und innerhalb der nächsten Tage gemessen. Bei jeder Messung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Negativkontrollen dienten unspezifisch bindende Antikörper (Isotypkontrollen). Die fixierten FACS-Proben wurden im Kühlschrank aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu verhindern.

## D. METHODEN

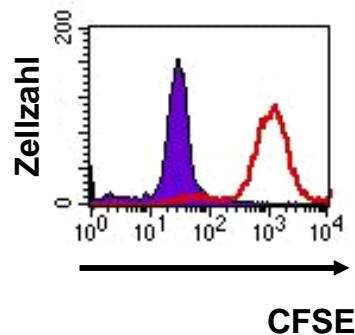
---

### 5.3 Indirekte Färbungen

Unmarkierte Antikörper mussten indirekt nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Zellen wie unter 5.2 beschrieben mit dem ersten unmarkierten Antikörper (Primärantikörper) für 30-45 Minuten inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten PE-markierten Antikörper (Sekundärantikörper) inkubiert und gewaschen. Als Isotypkontrollen dienten nicht-bindende, unmarkierte Primärantikörper.

### 5.4 Antikörpertest

Für die Bestimmung von Antikörperkandidaten aus Hybridomüberständen von Fusionen aus Milzzellen immunisierter Long-Evans-Ratten und muriner AG8-Zellen, wurden K-562 Wildtypzellen mit CFSE gefärbt (Methoden 7.2). 50.000 CFSE-gefärbte K-562-Zellen wurden zusammen mit 50.000 K-562-ULBP4-Transfektanten und 50 µl des jeweiligen Hybridomaüberstands in je einer Mulde einer 96-Mulden-Platte vermischt und 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Waschen und Zentrifugation wurden die Zellen mit je 50 µl (1:5) Ziege-anti-Ratte-IgG-APC für 45 Minuten bei 4°C inkubiert, erneut gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und anschließend am FACS-Gerät gemessen. Zur Kontrolle wurde am Tag des Tests eine FACS-Analyse der CFSE-gefärbten K-562-Zellen und ungefärbten K-562 durchgeführt, um die Qualität der CFSE-Färbung zu bestimmen.



**Abbildung D4:** Überlagerung der Histogramme CFSE-gefärbter K-562-Zellen (rot) und ungefärbter K-562 (violett) am Tag des Antikörpertests als Kontrolle der CFSE-Färbung.

### 5.5 Auswertung der FACS-Daten

Die am FACS-Calibur<sup>TM</sup> ermittelten FACS-Daten wurden mit der CellQuest-Software (Version 3.3) von BD Biosciences ausgewertet. Falls nicht anderweitig angegeben, wurde auf lebende Zellen im FSC-H und SSC-H eingestellt. Bei Mehrfachfärbungen erfolgte die Auswertung im Sinne der Bool'schen Algebra.

### 6. Ermittlung der Zytotoxizität im $^{51}\text{Cr}$ Chromfreisetzungstest

#### 6.1 Behandlung der Zielzellen

Zur Untersuchung der zellvermittelten Lyse (*cell mediated lysis*, CML) wurden Chromfreisetzungstests durchgeführt. Hierfür wurden die Zielzellen mit radioaktivem Chrom ( $^{51}\text{Cr}$ ) markiert, das bei einer Lyse der Zielzelle durch die Effektorzelle in den Überstand freigesetzt wird und somit im Überstand nachgewiesen werden konnte. Etwa  $3 \times 10^6$  Zielzellen wurden in 200  $\mu\text{l}$  FBS aufgenommen und mit 40-50  $\mu\text{l}$  radioaktivem Natriumchromat (ca. 85  $\mu\text{Ci}$ , in RPMI III verdünnt) für 90 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit wurde das radioaktive Nuklid von den Zielzellen aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 ml CML-Medium für 5 Minuten bei 472 x g gewaschen und gezählt. Die Zielzellen wurden dann in das berechnete Endvolumen in entsprechender Zellzahl überführt.

#### 6.2 Direkte zellvermittelte Lyse

Für die direkte zellvermittelte Lyse wurden die Effektorzellen auf 96-Loch-Rundboden-Platten in abnehmenden Zellzahlen in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  vierfach titriert. Hierfür wurden in ein Loch jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Effektorzellen, mit der doppelten gewünschten Zellzahl für ein spezifisches Verhältnis von Effektorzelle zu Zielzelle pipettiert. Dieses Verhältnis lag zwischen 10:1 und 40:1. Anschließend erfolgte eine Titration von je 50  $\mu\text{l}$  zu 50  $\mu\text{l}$  vorgelegten CML-Mediums. Die markierten Zielzellen wurden in konstanter Zahl von 2000 Zellen pro 50  $\mu\text{l}$  und Loch auf die Effektorzellen verteilt, so dass abnehmende Effektor-zu-Zielzell Verhältnisse erzeugt wurden. Für jede Probe ergab sich dadurch ein Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$ . Nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit bei 37 °C wurden 50  $\mu\text{l}$  des Überstands pro Ansatz auf die Messplatten übertragen. Alle Ansätze wurden als Duplikate mitgeführt. Zur Bestimmung der spontanen Chromfreisetzung der Zielzellen wurde ein Ansatz nur mit Zielzellen und 50  $\mu\text{l}$  CML-Medium inkubiert. Für die maximale Chromfreisetzung wurden 50  $\mu\text{l}$  der Zielzelle direkt auf die Messplatte übertragen.

#### 6.3 Redirigierte Lyse

Für die redirigierte Lyse wurde die murine Mausmastozytomlinie P815 als Zielzelle verwendet, die Fc Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimiert. Da die verwendeten Antikörper aus der Maus stammen, konnte die Zielzelle P815 mit ihnen beladen werden. Hierfür wurden 25  $\mu\text{l}$  Antikörper in einer 96-Loch-Platte in absteigender Konzentration

## D. METHODEN

---

vierfach titriert, wobei 25 µl Medium vorgelegt wurden und 50 µl Antikörper mit der doppelten Konzentration ins erste Loch pipettiert wurde. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur mit jeweils 1000 <sup>51</sup>Cr markierten P815 Zellen (in 50 µl) wurden 25 µl Effektorzellen in konstanter Zellzahl zu den Ansätzen gegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 100 µl ergab, von dem nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit je 50 µl des Überstandes auf die Messplatten überführt wurde. Bei diesem Versuch konnten also die Effekte verschiedener Antikörperkonzentrationen bei einem gleich bleibenden Effektor-zu-Zielzell Verhältnis verglichen werden. Die Ansätze wurden in Duplikaten pipettiert und die spontane Lyse sowie die maximale Chromfreisetzung wurden wie unter 6.2 beschrieben pipettiert.

### 6.4 Messung und Auswertung

Die Messplatten wurden über Nacht zum Trocknen unter den Abzug gestellt und am nächsten Tag mit Folie abgeklebt und im *TOPCount*-Zählgerät gemessen. Die radioaktive Strahlung wurde durch die Beschichtung der Messplatten in Lichtquanten umgewandelt, die das Zählgerät in Lichtemissionen pro Minute (*counts per minute*, cpm) berechnet. Der Prozentsatz spezifischer Lyse ergibt sich aus der Formel:

$$\frac{\text{gemessene } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}{(\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} : 2) - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}$$

Der Wert der maximalen Chromfreisetzung musste durch zwei geteilt werden um die Verdünnung der restlichen Proben zu berücksichtigen, da die Zielzellen für diesen Wert direkt und unverdünnt auf die Messplatte pipettiert wurden.

## 7. CFSE-Proliferations-Test

### 7.1 CFSE

CarboxyFluoresceinSuccinimidylEster (CFSE) ist ein nicht-zelltoxischer Vitalfarbstoff, der nach passiver Einschleusung in die Zellen irreversibel an Zellproteine bindet. Nach der Hydrolyse der Estergruppe durch intrazelluläre Esterasen emittiert das Molekül nach Anregung Licht mit einer Wellenlänge von 517 nm (grün). Die Fluoreszenz von CFSE hält in Zellen über einen langen Zeitraum hinweg an (mehrere Wochen) und die Intensität halbiert sich in proliferierenden Zellen bei jeder Teilung. Dadurch kann der Verlauf der Proliferation von Zellen leicht verfolgt werden. Durch Gegenfärbung mit Zellmarkern für spezifische Zellpopulationen kann auch in einer Mischung aus unterschiedlichen Zelltypen die proliferierende Spezies mittels FACS-Analyse ermittelt werden.

### 7.2 Anfärbung mit CFSE

Für den CFSE-Proliferationstest wurden die nach 2.2.3 isolierten PBMC nach 24h Kultivierung in RPMI III + 10% HS einer Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen, die Zellen mit RPMI III gewaschen in PBS aufgenommen und die Zellzahl nach 2.3 bestimmt. Anschließend wurde 1  $\mu$ M CFSE in Medium (Endkonzentration) zu den Zellen gegeben und 15 Minuten bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 472 x g) wurden die Zellen in eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend je nach Zellzahl in bis zu 30 ml Medium (RPMI III + 10%HS) aufgenommen und 30 Minuten bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Waschen mit Medium wurde die Zellzahl erneut bestimmt.

### 7.3 Proliferationstest

Pro Ansatz wurden  $2 \times 10^6$  CFSE-markierte Zellen mit bestrahlten (80Gy) Stimulatorzellen (K-562, K-562 E) für 5 Tage bei einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 10 zu 1 in 24-Mulden-Platten (2ml Endvolumen pro Mulde) in einer Stahlbox bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> koinkubiert. Als Proliferationskontrolle diente ein Ansatz mit CFSE-markierten Zellen ohne Stimulation. Die mit ca. 1 cm autoklaviertem Wasser befüllte Stahlbox diente dazu, dass konstante Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen, selbst bei vorübergehendem Öffnen des Inkubators erreicht wurden. Direkt nach der CFSE-Färbung wurde eine Färbungskontrolle abgeführt und mit PFA für die spätere Untersuchung am FACS-Gerät fixiert. Am Tag 5 der Koinkubation wurden die Zellen geerntet und in FACS-Puffer aufgenommen. Je 50  $\mu$ l Zellsuspension wurden mit CD3 $\epsilon$ -PerCP und CD19-APC bzw. CD56-APC gemäß 5.2 angefärbt.

### 8. CD107a-Degranulations-Assay

Die nach 2.2 isolierten PBMC wurden auf die CD107a-Degranulation nach Stimulus durch unterschiedliche Zielzellen untersucht. Das lysosomal assoziierte Membranprotein LAMP-1 (CD107a) ist als Marker der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Degranulation bekannt (Penack, Gentilini et al. 2005). Die Expression von CD107a verstärkt sich auf NK-Zellen nach Stimulation mit MHC-negativen Zellen. CD107a kann daher als Merkmal für die Aktivität von NK-Zellen nach Stimulus angesehen werden.

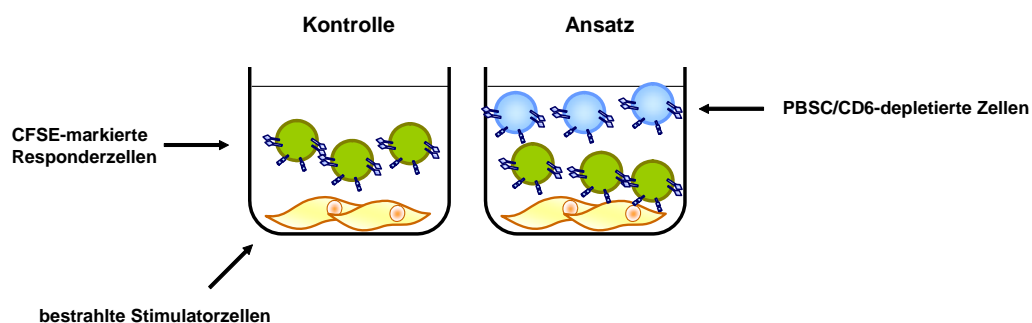
## D. METHODEN

### Durchführung

Die PBMC wurden nach 24h Kultivierung in RPMI III + 10% HS (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) geerntet und gezählt. Die Stimulation von 1x10<sup>6</sup> Effektorzellen erfolgte in Micromics-Röhrchen in einem Volumen von 200 µl Medium (RPMI III + 10%HS), wobei ein Effektor-Zielzell-Verhältnis von 1:1 eingehalten wurde. Die Zellen wurden mit 10 µl CD107a (PE oder FITC-markiert) 1 Stunde bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Monensin (200µg/ml) zugegeben, um LAMP-1 an der Oberfläche der Zellen zu arretieren. Nach weiteren 2h Inkubation bei 37°C wurden 800 µl PBS zugegeben und 9 Minuten bei 472 x g zentrifugiert, um überschüssiges CD107a und Monensin zu entfernen. Danach wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit je 2 µl fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegengefärbt (CD3ε-PerCP, CD56-APC). Für die Einstellung am FACS-Gerät wurden weitere Kontrollfärbungen und Isotypenkontrollen mitgeführt

### 9. Toleranzexperiment

Um eine mögliche suppressive Wirkung der NK-Zellen in den Spender-PBMC nachzuweisen, wurde ein Toleranzexperiment konzipiert, bei dem CFSE-markierte Responderzellen (PBL der Spender, bzw. NTCB) mit bestrahlten Stimulatorzellen sowie ungefärbten PBSC bzw. CD6-depletierten PBSC kokultiviert wurden. Dabei sollte im Vergleich zu einem nur Responderzellen und Stimulatorzellen enthaltenden Kontrollansatz ein möglicher Unterschied in der Proliferation (vergleiche CFSE-Proliferationstest) mittels FACS-Analyse nach Kokultivation für 5 Tage nachgewiesen werden.



**Abbildung D5:** Schematische Darstellung des Versuchsansatzes des Toleranzexperimentes.

### Ansatz und Durchführung

Gemäß 2.2 isolierte PBMC aus PBL von Spender vor G-CSF-Mobilisierung (Präparat aus der III. Medizinischen Klinik der LMU) bzw. isolierte NTCB dienten als Responderzellen und wurden gemäß 2.5.1 aufgetaut und nach 7.2 mit CFSE gefärbt. Stimulatorzellen aus dem

## D. METHODEN

---

korrespondierenden Patienten wurden gemäß 2.5.1 aufgetaut und 120 Minuten bestrahlt (80 Gy). Die PBSC bzw. CD6-depletierten Zellen des Spenders wurden gemäß 2.5.1 aufgetaut und ungefärbt eingesetzt. In einer 24-Mulden-Platte wurden pro Mulde je  $1 \times 10^6$  Responder- und Stimulatorzellen und PBSC/CD6-depletierte PBSC in einem Endvolumen von 2 ml für fünf Tage in einer Stahlbox bei  $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$  inkubiert. Gleichzeitig wurde ein Ansatz mit Responder- und Stimulatorzellen ohne Zugabe von Zellen aus PBSC bzw. CD6-depletierten PBSC für fünf Tage inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, in 50  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert und mit CD3 $\epsilon$ -PerCP und CD56-PE gefärbt. Gleichzeitig wurden Aliquots für eine Isotypenkontrolle abgenommen, um die Kompensation am FACS-Analysegerät zu ermöglichen.

### 10. $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau

Zum Vergleich des oben angeführten Verfahrens, wurde ein  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbautest durchgeführt. Es wurden Aliquots der Ansätze aus 9.2 entnommen sowie Kontrollansätze mitgeführt, die  $1 \times 10^6$  Zellen Responder, bestrahlte Stimulatorzellen oder PBSC/CD6-depletierte PBSC (Effektorzellen) alleine enthielten. Diese Ansätze wurden mit je 1  $\mu\text{Ci}$  radioaktivem  $^3\text{H}$ -Thymidin versetzt und die Zellen 24h bei  $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und fünfmal mit Medium nachgewaschen. Nach kurzem Eintrocknen wurde die Platte auf der Unterseite abgeklebt und je 25  $\mu\text{l}$  Szintillationsflüssigkeit zu jedem Loch gegeben, die Platte oben abgeklebt und der Einbau von radioaktivem Thymidin am Beckman LS5000TA als Zerfallsereignisse pro Minute (counts per minute, cpm) gemessen.

### 11. Statistik

Vergleiche zwischen KIR-Genen bzw. KIR-Haplotyp und der akuten GvHD sowie zwischen HLA-C-Allel-Gruppen und der akuten GvHD erfolgte mittels  $\chi^2$ -Test. Die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit der untersuchten Patienten erfolgte mittels Kaplan-Meier-Schätzer, wobei die Signifikanz durch einen Log-Rank-Test bestimmt wurde. Zensierte Patienten (also zum Zeitpunkt der statistischen Berechnung noch lebende Patienten) sind in den Kaplan-Meier-Kurven durch einen vertikalen Strich auf der Kurvenverlaufslinie gekennzeichnet. Die Berechnungen der statistischen Signifikanz für die funktionellen Daten der Spender-Präparate erfolgten nach Wilcoxon signed-Rank-test. Für die Berechnung der Signifikanzwerte wurde die Software Prism (Version 4.0c) bzw. S-Plus (Hearne, Version 7.0) verwendet.

### E. ERGEBNISSE

#### 1. Charakterisierung der individuellen funktionellen Unterschiede verschiedener NK-Linien

Natürliche Killerzellen werden durch eine Vielzahl aktivierender und inhibierender Rezeptoren gesteuert. Die Entscheidung, ob eine NK-Zelle durch eine Zielzelle aktiviert wird und daraufhin Zytokine freisetzt bzw. zytotoxisch wirkt oder aber inaktiv bleibt, hängt davon ab, welcher Subpopulation die NK-Zelle angehört (CD56<sup>dim</sup>- oder CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen) und ob die Summe der aktivierenden Signale durch die Rezeptoren stärker als die Summe der inhibierenden Signale ist. Durch die Bestimmung des Phänotyps und die Untersuchung der Aktivierung verschiedener NK-Zelllinien durch K-562-Zellen, die im Zuge dieser Arbeit mit einem Liganden für den aktivierenden Rezeptor NKG2D stabil transfiziert wurden, sollte die Biologie der NK-Zellen beschrieben und eine Grundlage für funktionelle Untersuchungen der alloreaktiven NK-Zellen in HSZT (Hämatopoetische Stammzelltransplantation) erarbeitet werden. Darüber hinaus sollte durch das Multiplex-Verfahren die Grundlage für die Untersuchung der Signalwege von NK-Zellen geschaffen werden. Weiterhin sollte durch die Isolierung von NK-Zellen aus PBL (Periphere Blutlymphozyten) eines Normalspenders und anschließende CD6-Depletion mittels magnetischer Beads (DynaBeads und AutoMACs-Sorter) der Einfluss der CD6-Depletion auf eine IL-2-stimulierte NK-Population untersucht werden.

##### 1.1 Der aktivierende Rezeptor NKG2D und sein Ligand ULBP4

Die Expression von Selbst-MHC-Klasse-I-Molekülen auf Zielzellen führt im Allgemeinen zu einer Inhibition der NK-Zell-Aktivität. Cosman et al. konnten jedoch zeigen, dass diese durch MHC-Klasse-I-Moleküle vermittelte Inhibition durch aktivierende Signale über NKG2D, z.B. in Form der Liganden ULBP1-3 und MICA und MICB, umgangen werden kann (Cosman, Mullberg et al. 2001; Sutherland, Chalupny et al. 2002). Die ULBP-Proteine werden auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert, eingeschlossen Tumorzellen und Zellen die einer Infektion oder Stress unterliegen (Das, Groh et al. 2001; Groh, Rhinehart et al. 2001; Tieng, Le Bouguenec et al. 2002). Die ULBP- und MIC-Proteine spielen daher eine gewichtige Rolle bei der Erkennung entarteter oder veränderter Zellen, die solche Moleküle exprimieren und gleichzeitig noch Selbst-MHC-Klasse-I-Moleküle tragen. Die MHC-Klasse-I-verwandten ULBP-Proteine werden im Menschen auf Chromosom 6 (6q24.2-q25.3), außerhalb der MHC-Region, kodiert. Die  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen von ULBP4 ähneln den Domänen der schon

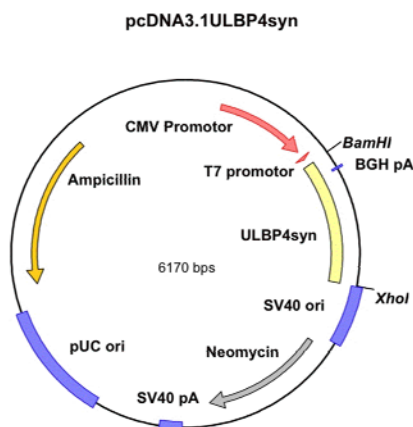


## E. ERGEBNISSE

länger identifizierten Moleküle ULBP1-3. ULBP4 unterscheidet sich von diesen jedoch durch das Vorliegen einer Transmembranregion und einer zytosolischen Domäne, und dadurch, dass es sich nicht um ein GPI-verknüpftes Molekül (GPI, glykosiliertes Phosphatidyl-Inositol) handelt. Die Bindung von ULBP4 an NKG2D auf NK-Zellen führt *in vitro* zur zytotoxischen Aktivität der so stimulierten NK-Zellen. Mittels PCR-Versuchen und cDNS aus unterschiedlichen Gewebearten konnte ULBP4 in der Haut, Trachea und den Testis nachgewiesen werden (Chalupny, Sutherland et al. 2003). In Bezug auf Leukämiezellen wurde festgestellt, dass ULBP3 auf B-CLL-Zellen exprimiert wird (Poggi, Venturino et al. 2004). Im Fall der chronisch-myeloischen Leukämie (CML) ist bekannt, dass im Gegensatz zu soliden Tumoren keine verminderte Expression von Selbst-HLA-Klasse-I-Molekülen zu beobachten ist. Jedoch werden die Liganden für den aktivierenden Rezeptor NKG2D weniger stark exprimiert, wodurch es den Blastenzellen möglich ist, dem Angriff der NK-Zellen zu entgehen (Nowbakht, Ionescu et al. 2005; Pende, Spaggiari et al. 2005). Da es zu Beginn dieser Arbeit nur für ULBP1-3 käufliche monoklonale Antikörper gab, sollte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Kremmer am Institut für Molekulare Immunologie ein monoklonaler Antikörper gegen ULBP4 hergestellt werden und damit die mögliche Expression von ULBP4 auf Leukämiezellen von Patienten sowie in anderen Geweben untersucht werden. Das Fehlen oder Vorliegen einer ULBP4-Expression könnte im Zusammenhang mit klinischen Daten einen Aufschluss über einen Mechanismus der Alloreaktivität von NK-Zellen bei der haploidentischen HSZT geben.

### 1.1.1 Klonierung von ULBP4 und Erzeugung stabiler K-562-Transfektanten mit ULBP4 Expression

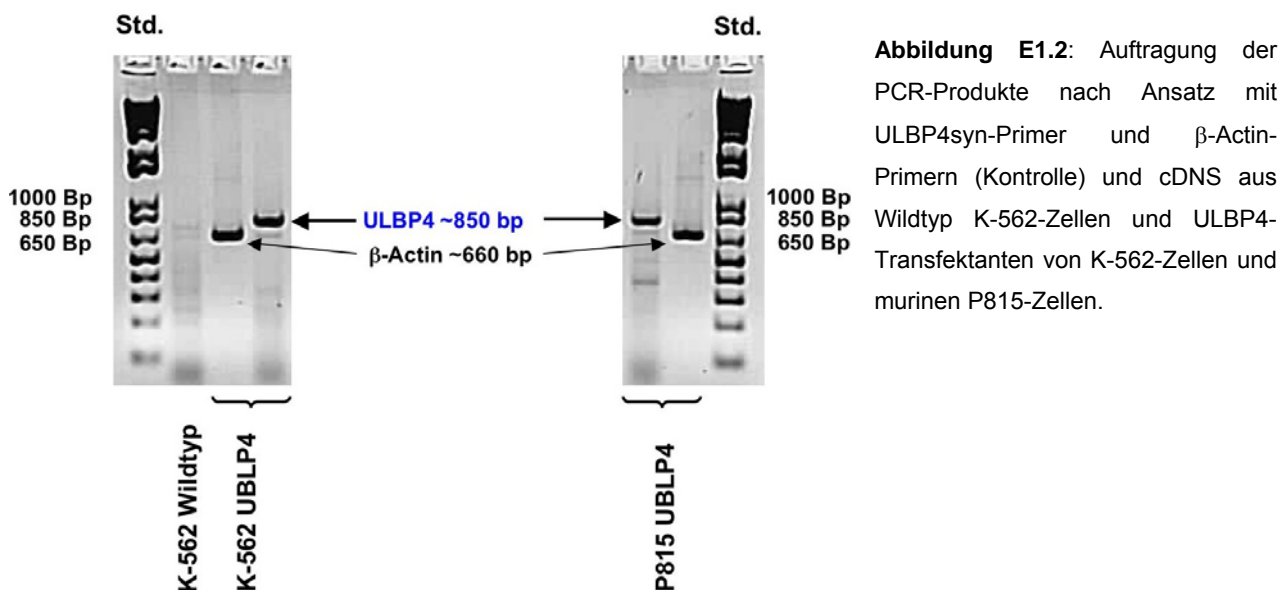
Zur Erzeugung stabiler ULBP4-Transfektanten und Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen humanes ULBP4 wurde ein an die humane Codonzuordnung angepasstes synthetisches Gen von ULBP4 in Zusammenarbeit mit der Firma Geneart AG (Regensburg) konzipiert, vervielfältigt und in den Vektor pcDNA3.1(+) kloniert. Als Restriktionsenzyme wurden dafür *Bam*HI und *Xho*I verwendet.



**Abbildung E1.1:** Schematische Darstellung des Vektors pcDNA3.1ULBP4syn.

## E. ERGEBNISSE

Mit dem Vektorkonstrukt (Abbildung E1.1) wurden anschließend murine P815-Zellen (Mastozytomzellen) und humane K-562-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Dadurch konnten Zelllinien erzeugt werden, die unter Selektionsdruck (G418, 0,4 mg/ml) den Vektor trugen und das transfizierte Gen exprimierten. Der Nachweis der Oberflächenexpression erfolgte über die Bindung des NKG2D-Tetramers (Daten nicht gezeigt, Kooperation mit Labor Prof. Dr. Dirk Busch). Wildtyp K-562-Zellen weisen keine mRNA für ULBP4 auf. Nach Isolation von Gesamt-RNS aus den mit ULBP4 transfizierten Zelllinien K-562-ULBP4 sowie P815-ULBP4 und Umschreiben in cDNS konnte in den Transfektanten mRNA für ULBP4 nachgewiesen werden.



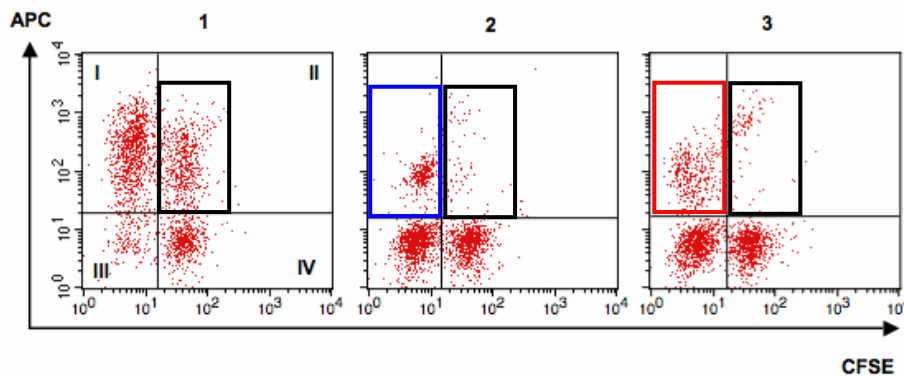
Mit den so erzeugten Transfektanten sollte der Effekt von ULBP4 auf die Funktion verschiedener NK-Zelllinien getestet sowie ein monoklonaler Antikörper erzeugt werden.

### 1.1.2 Erzeugung eines monoklonalen Antikörpers gegen ULBP4

Die mit pcDNA3.1ULBP4syn transfizierten P815-Zellen (P815-ULBP4) wurden zusammen mit Adjuvans (inkomplettes Freudsches Adjuvans + CPG 2006) in zwei Long-Evans-Ratten intraperitoneal und subkutan injiziert (Zellfragmente von  $40 \times 10^6$  Zellen in PBS, Labor Dr. E. Kremmer, IMI, GSF). Nach 7 Wochen erfolgte eine Auffrischung (*Boost*, ohne Adjuvans) mit Zelltrümmern aus einer identischen Anzahl von Zellen. 6 Tage nach Auffrischung wurden die Ratten getötet. Milzzellen der beiden Ratten wurden isoliert und mit AG-8-Zellen fusioniert. Anschließend wurden die Hybridomzellen in 96-Mulden-Platten vereinzelt. Nach 12 Tagen Inkubation konnten so 616 Hybridomansätze gewonnen werden, deren Überstände in einem Antikörpertest (Methoden 5.4) unter Verwendung der K-562-ULBP4-Transfekte und CFSE-gefärbter K-562 Wildtyp-Zellen auf ihre Spezifität für ULBP4 getestet wurden. Durch

## E. ERGEBNISSE

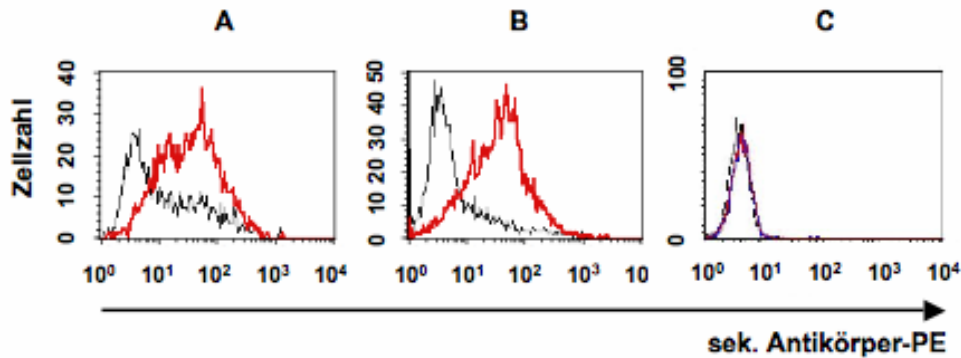
die CFSE-Färbung der Wildtyp-K-562-Zellen sollten eine Unterscheidung von den ULBP4-Transfektanten ermöglicht werden. Die CFSE-gefärbten K-562-Zellen und die ungefärbten K-562-ULBP4-Transfektanten wurden in gleicher Zellzahl vermischt und die Antikörperkandidaten zugegeben. Durch Färbung mit einem APC-markierten Sekundärantikörper gegen Ratte-IgG, also gegen die erzeugten Hybridom-Antikörper, sollte anschließend die Spezifität der Erkennung der einzelnen Antikörperkandidaten sichtbar gemacht werden. Bei hoher Spezifität der erzeugten Hybridom-Antikörper gegen ULBP4-Transfektanten (und damit gegen das überexprimierte Molekül ULBP4) sollten bei einer FACS-Analyse dann vorwiegend CFSE-negative und gleichzeitig APC-positive Zellen nachweisbar sein. Durch den Test konnten so 46 Antikörperkandidaten ermittelt werden (Abbildung E1.3 veranschaulicht den Test).



**Abbildung E1.3:** Test der Antikörperkandidaten. Mischung (1:1) aus CFSE-gefärbten K-562-Wildtypzellen und ungefärbten K-562-ULBP4-Transfektanten nach Färbung mit Ziege-anti-Ratte-IgG-APC. Es wurden solche Antikörperkandidaten für die weitere Verarbeitung ausgewählt, die nur eine geringe APC-CFSE-Doppelfärbung und damit eine erwartete hohe Spezifität für ULBP4 zeigten (2 und 3 in der Abbildung). 1: Antikörperkandidat mit unspezifischer Erkennung eines Epitops auf K-562-Wildtypzellen (schwarzer Rahmen, CFSE- und APC- doppelt gefärbte Zellen). 2 und 3: Antikörperkandidaten mit Erkennung von K-562-ULBP4-Transfektanten (blauer Rahmen und roter Rahmen).

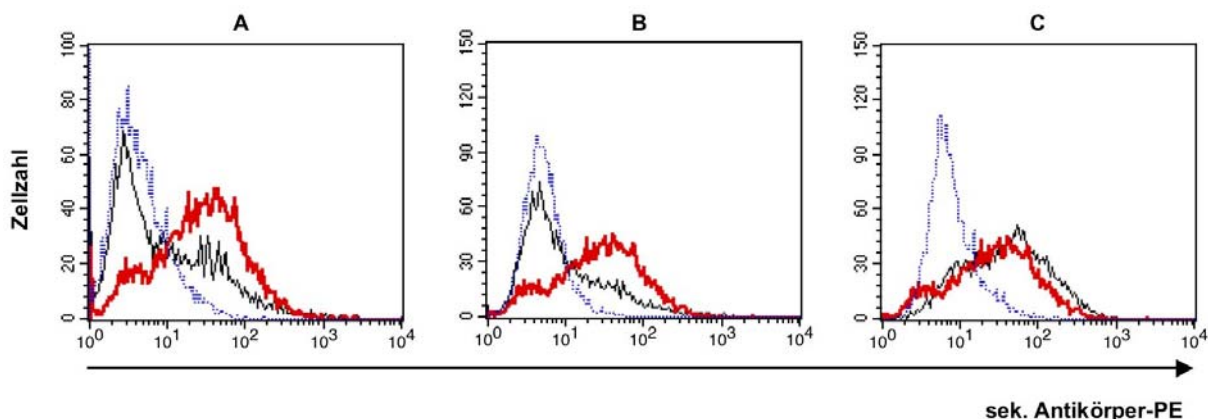
Die 46 Kandidaten aus der ersten Testrunde wurden rekloniert und in einem zweiten Ansatz getestet, wobei wieder die Bindung der Antikörperkandidaten an K-562-ULBP4-Transfektanten im Vergleich zur Bindung an untransfizierte K-562 als Entscheidungsgrundlage für das Vorliegen einer spezifischen Erkennung von ULBP4 durch den Antikörperkandidaten diente. Nach Bindung der jeweiligen Antikörperüberstände wurde mit Ziege-anti-Ratte-IgG-PE (Sekundärantikörper) gefärbt und mit der CellQuest™-Software eine Überlagerung der entsprechenden Histogramme erzeugt (Abbildung E1.4, Seite 76).

## E. ERGEBNISSE



**Abbildung E1.4:** Überlagerung der Histogramme; zwei Antikörperkandidaten (A,B) mit Erkennung von ULBP4 und Kontrolle (C, ohne 1. Antikörper); K-562-ULBP4 (rot), K-562 (schwarz), Isotypkontrolle (blau). Färbung mit Ziege-anti-Ratte-IgG.

Bei den beiden in Abbildung E1.4 gezeigten Antikörperkandidaten konnte neben der Erkennung der ULBP4-Transfektanten (rote Linie) auch eine geringe unspezifische Erkennung von Epitopen auf K-562-Wildtypzellen (schwarze Linie im Histogramm) beobachtet werden. Der Kontrollansatz (C) schließt eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers aus. Durch den zweiten Test konnten so 8 vielversprechende Kandidaten ermittelt werden, wobei jedoch bei allen Kandidaten eine schwache Erkennung von Epitopen auf K-562-Wildtypzellen durch die Antikörper zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Mit diesen 8 Antikörperkandidaten wurden in jeweils getrennten Ansätzen neben der ULBP4- noch weitere HLA-Klasse-Ia- und -Klasse-Ib-Transfektanten von K-562 markiert und mit einem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Ratte-IgG-PE) gefärbt. Dabei stellte sich nach Überlagerung der einzelnen Histogramme bei allen 8 Kandidaten eine unterschiedlich starke unspezifische Bindung an K-562-HLA-Klasse-Ia- und -Klasse-Ib-Transfektanten heraus (Abb. E1.5).



**Abbildung E1.5:** Überlagerung der Histogramme aus einer FACS-Messung eines Antikörperkandidaten; A: K-562-Wildtyp (schwarz), K-562-ULBP4 (rot), Isotypkontrolle (blau); B: K-562-E(2B4) (schwarz), K-562-ULBP4 (rot), Isotypkontrolle (blau); C: K-562-Cw\*0304 (schwarz), K-562-ULBP4 (rot), Isotypkontrolle (blau). Färbung mit Ziege-anti-Ratte-IgG.

Wie aus den Abbildungen E1.5 und E1.4 hervorgeht, erkennen die erzeugten Antikörper überraschenderweise Antigene auf K-562-Wildtyp-Zellen (die eigentlich keine mRNA für ULBP4 besitzen, siehe Abbildung E1.2, Seite 76) und auch auf den HLA-Transfektanten K-562-E(2B4) und K-562-Cw\*0304 (schwarze Linie in den Histogramme B und C, Abb. E1.5, Seite 78). Die Erkennung ist im Fall der K-562-Cw\*0304-Transfektante nahezu identisch mit der Erkennung der ULBP4-Transfektante von K-562 (Abb. E1.5 C: rote Linie K-562-ULBP4, schwarze Linie K-562-Cw\*0304). Abbildung E1.5 ist stellvertretend für alle 8 Kandidaten aus der zweiten Antikörpertestung nach Reklonierung. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die 8 erhaltenen Antikörperkandidaten nicht weiter rekloniert.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die Antikörperkandidaten nicht die gewünschte spezifische Bindung an das auf den transfizierten Zellen exprimierte Antigen (ULBP4) besitzen. Die erfolgreich erzeugten ULBP4-Transfektanten zeigten eine stabile Transkription des Vektors pcDNA3.1- ULBP4syn unter Selektionsdruck (G418) und eine Expression des gewünschten Antigens an der Oberfläche. Mit diesen Transfektanten konnten Untersuchungen der Wirkung der ULBP4-Expression auf K-562-Zellen auf verschiedene NK-Zelllinien durchgeführt werden.

### **1.1.3 Untersuchung des Effekts der ULBP4-Transfektanten auf die Funktion verschiedener NK-Zelllinien**

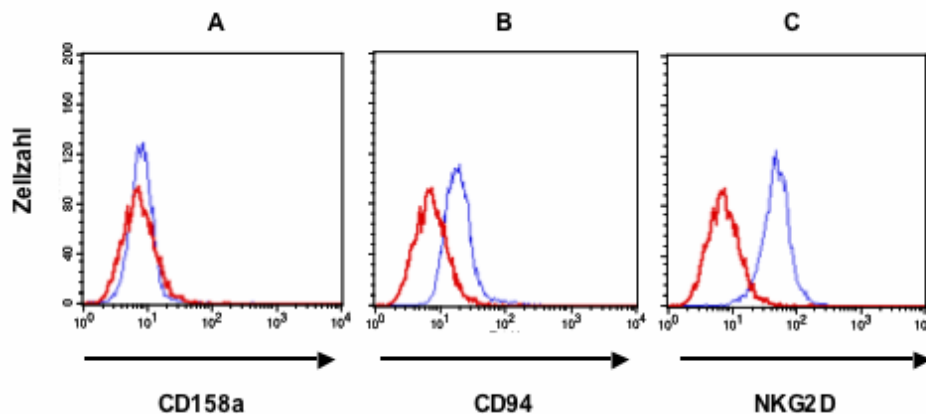
#### **1.1.3.1 Phänotyp verschiedener NK-Zelllinien**

Vor Untersuchung des Einflusses der ULBP4-Expression auf Zielzellen in Bezug auf die Zytotoxizität verschiedener NK-Zelllinien (NKL, NK92, YT und B.3NK) wurde die Oberflächenexpression einiger NK-Zellrezeptoren mittels FACS-Analyse bestimmt. Die FACS-Untersuchung erfolgte gemäß Methoden 5.2. NKL, NK92 und YT stellen humane NK-Leukämiezellen dar, die in Anwesenheit von IL-2 proliferieren. Bei der B.3NK-Linie handelt es sich um eine allogene NK-Linie, die aus einer gemischten Lymphozytenkultur des Spenders B gegen Lymphozyten des Spenders 3 stammt. Diese Linie muss regelmäßig allogenen stimuliert werden, um die Proliferation aufrecht zu erhalten. Für die FACS-Analysen wurden pro Ansatz vier unterschiedlich markierte Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmarker gleichzeitig gefärbt und daneben zusätzliche Isotypenkontrollansätze für die Kompensation am Messgerät angesetzt. Die nachfolgende Tabelle T1.1 zeigt die Expression verschiedener Rezeptoren auf den untersuchten NK-Linien. Abbildung E1.6 zeigt exemplarisch die Auswertung der Durchflusszytometriedaten (FACS-Daten).

## E. ERGEBNISSE

Rezeptor	NKL	YT	NK92	B.3NK
CD94	+	-	++	++
NKG2D	++	(+)	+	+
CD56	(-)	-	(+)	+
CD16	(+)	-	-	+
2B4 (CD244)	+	++	++	+
CD48 (2B4-L)	(+/-)	+	++	+
CD85 j (ILT-2)	+	-	+	+
CD25 IL-2 Ra	+++	(+)	-	-
NKp30	(+)	(+)	(+/-)	+
NKp44	(+)	(+)	(+)	+
NKp46	(+)	(+/-)	(+)	(+)
CD45RO	(+)	(+)	(+)	+
CD158e1/2 (NKB1, p70)	-	-	-	-
CD158a (p58.1)	-	-	-	-
CD158b (p58.2)	-	-	-	+
CD158j (p50.3, 2DS4)	-	-	-	+
CD161	(+/-)	-	-	+

**Tabelle T1.1:** Übersicht über die Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren auf NK-Zelllinien. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Verschiebung der Expressionen im Histogramm, wobei ++ eine mittelstarke und +++ eine starke Verschiebung bedeutet. (+) steht für eine schwache Verschiebung auf einem Teil der Population, (+/-) bedeutet, dass die Population in eine positive und eine negative Population unterteilt werden kann und – bedeutet, dass die Zellen keine Oberflächenexpression des betreffend Markers aufweisen.



**Abbildung E1.6:** Auswertung der Durchflußzytometriedaten in Bezug auf Tabelle T1.1. Dargestellt sind exemplarische Färbungen der NK-Linie NKL mit A: CD158a (p58.1); B: CD94; C: NKG2D in Form einer Überlagerung der Isoytpkontrolle (rote Linie) und des jeweiligen Antikörpers (blau). A entspricht einer fehlenden Oberflächenfärbung [-], B entspricht einer schwachen [(+)] und C entspricht einer eindeutigen Oberflächenfärbung [++]. Je nach Expressionsstärke verschiebt sich das Histogramm also nach rechts.

Durch die FACS-Untersuchung konnte die Expression des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf den NK-Zelllinien NKL, NK92, und den allogenen NK-Zellen B.3NK und etwas schwächer

## E. ERGEBNISSE

---

auf der Zelllinie YT nachgewiesen werden (Tabelle T1.1, Seite 78). Die Expressionsdaten decken sich mit Untersuchungen der mRNA für NKG2D in den Zelllinien NKL und YT durch Dr. Marion von Geldern im Zuge ihrer Doktorarbeit („Induktion der nicht-MHC-restringierten T-Zell-Aktivität durch T-Zell-Rezeptor-unabhängige Zytokinstimulation und negative Regulation durch HLA-Klasse-I-Moleküle“, 2004), wobei in NKL eine starke Transkription von mRNA für NKG2D und in der Zelllinie YT nur eine schwache Transkription nachgewiesen werden konnte. Die NKL und YT-Zelllinie sind für den typischen NK-Marker CD56 negativ, die NK92 schwach und die B.3NK eindeutig CD56-positiv. CD16 wird nur schwach von NKL-Zellen und B.3NK-Zellen exprimiert. CD25 (IL-2-Rezeptor,  $\alpha$ -Kette) wird von NKL-Zellen stark, auf YT-Zellen nur schwach und auf B.3NK- und NK92-Zellen so gut wie gar nicht exprimiert. Der inhibierende Rezeptor CD85j (ILT-2) kann auf allen Linien, bis auf die YT-Linie nachgewiesen werden. Auch CD94, das zusammen mit NKG2A/C ein Heterodimer bildet ist bis auf die YT-Zelllinie auf allen Linien in unterschiedlich starker Expression zu finden. Die Linien NKL und B.3NK exprimieren im Vergleich zu YT und NK92 den aktivierenden Rezeptor 2B4 (CD244) schwächer. CD48 (2B4-Ligand) wird auf allen untersuchten NK-Linien exprimiert, verstärkt jedoch auf der Zelllinie NK92. Alle NK-Zelllinien weisen also eine 2B4- und gleichzeitig eine CD48-Expression auf. Aus dem Mausmodell ist bekannt, dass die Interaktion zwischen 2B4 und CD48 für die Proliferation und Entwicklung von NK-Zellen wichtig ist (Lee, Forman et al. 2006). Jedoch führt eine Interaktion zwischen CD48 und 2B4 auf unterschiedlichen NK-Zellen nicht zu einer Steigerung der zytotoxischen Aktivität zwischen NK-Zellen, da die Inhibition durch Rezeptoren, die MHC-Klasse-I-Moleküle binden das aktivierende Signal über die Bindung von CD48 an 2B4 überschreibt (Stark and Watzl 2006).

Mit Ausnahme der B.3NK (Expression von KIR2DL2/3, CD158b, p58.2) zeigte keine der untersuchten NK-Linien eine Expression von KIR-Rezeptoren (CD158a/b/j). Auch CD158e1 (NKb1/p70), der KIR3DL1-Rezeptor für HLA-Bw4-Alloypen, wird von keiner der untersuchten Linien exprimiert. Die B.3NK weist als einzige der untersuchten Zelllinien eine Expression des aktivierenden KIR-Rezeptors KIR2DS4 (CD158i, p50.3) auf. Die NK-spezifischen aktivierenden Zellrezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46 werden von allen NK-Linien, wenn auch unterschiedlich stark, exprimiert. Die Expression von NKp44 ist durch die Stimulation mit IL-2 im NK-Zellemedium bedingt. YT zeigt eine verringerte Expression von NKp44, was mit der schwachen Expression von NKp46 (siehe Tabelle T1.1) zusammenpasst. Sivori et al. konnten zeigen, dass ein NKp46<sup>dim</sup>-Phänotyp mit einer geringen Expression von NKp44 korreliert (Sivori, Pende et al. 1999). Der aktivierende NK-Rezeptor CD161 (NKR-P1) wird nur von NKL und B.3NK exprimiert. Darüber hinaus besitzen alle Linien einen schwachen CD45RO-Phänotyp, der als „Memory“-Phänotyp bezeichnet wird.

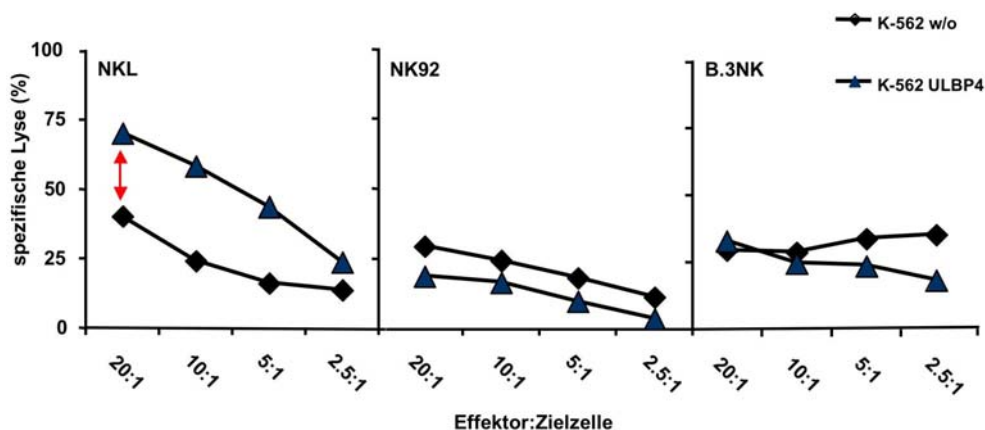
## E. ERGEBNISSE

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die etablierten NK-Zelllinien, NKL, NK92, YT und die allogene Linie B.3NK ein für die jeweilige NK-Zelllinie spezifisches Expressionsmuster an NK-Zellrezeptoren aufweisen. Die Zelllinie YT exprimiert im Vergleich zu den anderen NK-Linien ein begrenztes Repertoire von NK-Rezeptoren, wobei auch die Intensität der Expression geringer als bei den anderen Linien ausfällt. Die B.3NK-Linie zeigt hingegen ein breites Expressionsmuster an NK-Rezeptoren, vor allem jedoch die Expression von zumindest zwei KIR-Rezeptoren.

Die phänotypisch untersuchten NK-Zelllinien wurden anschließend in Bezug auf ihre Funktion nach Stimulus mit ULBP4-transfizierten Zielzellen untersucht und die Signaltransduktion nach chemischem Stimulus mittels biochemischer Verfahren verfolgt.

### 1.1.3.2 Zytotoxizität verschiedener NK-Zelllinien gegenüber K-562-ULBP4-Transfektanten

Die Expression des Liganden ULBP4 auf K-562-Zellen sollte zu einer Aktivierung von NK-Zellen nach Stimulation mit einer K-562-ULBP4-Transfektante führen. Der K-562-Wildtyp (K-562 w/o) wird im Chromfreisetzungsversuch von den NK-Zelllinien NKL, NK92 und B.3NK durch das Fehlen der HLA-Klasse-I-Expression erkannt und lysiert. K-562-Zellen exprimieren die NKG2D-Liganden ULBP1-3, MICA und MICB. Da sie gleichzeitig keine HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren, sollte eine ULBP4-Expression auf K-562-Zellen zu einer Steigerung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen nach Stimulation führen. Daher wurden K-562-ULBP4-Transfektanten in einem Chromfreisetzungsversuch (CML) im Vergleich mit Wildtyp K-562 als Zielzellen eingesetzt. Der Versuch wurde wie in Methoden 6 beschrieben durchgeführt. Als Effektorzellen dienten die NK-Zelllinien NKL, NK92 und B.3NK.



**Abbildung E1.7:** Auftragung Prozentsatz der spezifischen Lyse gegen Effektor-Zielzellen-Verhältnis. Gezeigt ist die spezifische Lyse von Zielzellen (K-562 w/o, K-562-ULBP4-UL2) durch die NK-Zelllinien NKL und NK92 und B.3NK.

Wie aus Abbildung E1.7 hervorgeht, lässt sich im Fall der NKL eine Steigerung der spezifischen Lyse der K-562-ULBP4-Transfektante (Linie mit blauen Dreiecken) um ca. 100

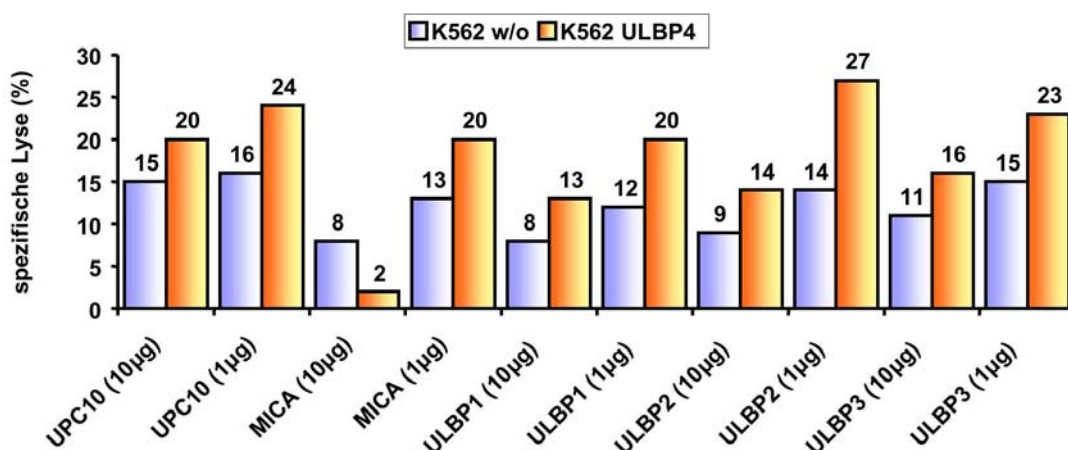


## E. ERGEBNISSE

% im Vergleich zur spezifischen Lyse des Wildtyp K-562 erkennen (roter Pfeil in Abbildung E1.7). Die Lyse folgt der Titration des Effektor-Zielzell-Verhältnisses und ist daher spezifisch. Bei NK92 und B.3NK lässt sich keine Steigerung der spezifischen Lyse durch die Transfektion der K-562-Zellen mit ULBP4 feststellen. Generell ist die Lyse von K-562-Zellen durch NK92 und B.3NK im Vergleich zur NKL-Linie vermindert. Dieses Ergebnis lässt sich durch die verringerte Expression von NKG2D auf NK92 und B.3NK im Vergleich zur NKL erklären (vgl. Tabelle T1.1, Seite 78), und lässt auf eine unterschiedliche Rolle von NKG2D bei der Aktivierung der untersuchten NK-Zelllinien schließen. Die Wechselwirkung zwischen ULBP4 und NKG2D spielt demnach nicht bei allen NK-Zelllinien eine dominante Rolle in Bezug auf die Induktion der zytotoxischen Aktivität, was auch durch die Anwesenheit anderer aktivierender Rezeptoren auf den NK-Linien NK92 und B.3NK im Vergleich zur NKL, wie z.B. den NCRs und 2B4 (CD244), zu erklären ist.

### 1.1.3.3 Einfluss der NKG2D-Liganden ULBP1,2,3 und MICA auf die Zytotoxizität der Zelllinie NKL gegenüber K-562 und der K-562-ULBP4-Transfektante

Um den Einfluss der NKG2D-Liganden ULBP1, ULBP2, ULBP3 und MICA auf die zytotoxische Aktivität der NKL genauer zu untersuchen, wurde ein Blockierungsexperiment durchgeführt, bei dem  $^{51}\text{Cr}$ -markierte K-562 Zellen bzw. die ULBP4-Transfektante von K-562 mit Antikörpern gegen die genannten Liganden vorinkubiert wurden. Bei diesem Einzelexperiment sollten die Antikörper an den jeweiligen Liganden binden und somit eine Erkennung durch den NK-Zellrezeptor NKG2D verhindern. In der Folge würde ein Rückgang der spezifischen Lyse durch die NK-Zellen zu beobachten sein.



**Abbildung E1.8:** Spezifische Lyse der Zielzellen K-562 w/o (Wildtyp) im Vergleich zur ULBP4-Transfektante von K-562 (K-562-ULBP4) durch NKL bei Blockierung einzelner NKG2D-Liganden auf den Zielzellen durch monoklonale Antikörper in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 mg/ml, 1 µg/ml). UPC10 dient als Isotypkontrolle. Das Effektor-Zielzellen-Verhältnis betrug 10:1.

## E. ERGEBNISSE

---

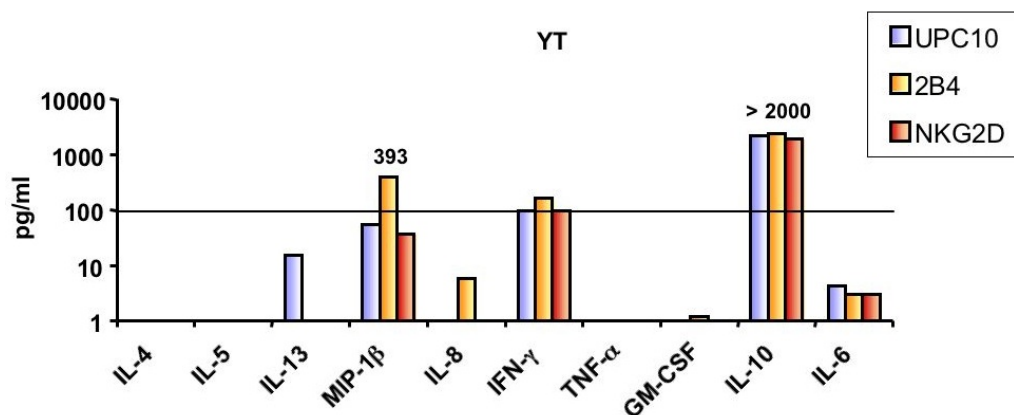
Aus Abbildung E1.8 (Seite 81) geht hervor, dass die ULBP4-Transfektante im Vergleich zum K-562-Wildtyp, bedingt durch die Expression des NKG2D-Liganden ULBP4, generell einer stärkeren Lyse durch NKL unterliegt. ULBP4 kompetiert mit der Bindung der anderen NKG2D-Liganden und führt so zu einer generell verstärkten zytotoxischen Aktivität der NKL-Zellen gegenüber der ULBP4-Transfektante im Vergleich zur Wildtyp-K-562. K-562 Wildtypzellen exprimieren ULBP1 und etwas schwächer ULBP2. ULBP3 kann jedoch im FACS nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Blockierung von ULBP1 mit 10 µg/ml anti-ULBP1-Antikörper führt dementsprechend zu einer schwachen Verringerung der Lyse von Wildtyp-K-562. Bei der ULBP4-Transfektante ist dieser Effekt weniger stark zu beobachten, was für eine Kompensation des fehlenden aktivierenden Signals über die Bindung von ULBP1 an NKG2D durch ULBP4 spricht. Dieser Effekt ist abhängig von der Konzentration des Blockierungsantikörpers. Ein ähnlicher, wenn auch abgeschwächter Effekt lässt sich bei Blockierung von ULBP2 erkennen. Im Fall der Blockierung von ULBP3 auf den Zielzellen lässt sich kein großer Unterschied zur Blockierung durch die Isotypkontrolle mit UPC10 erkennen. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass K-562 kein ULBP3 auf der Oberfläche exprimieren. Die geringe spezifische Lyse von K-562-ULBP4 (2%) im Vergleich zur Lyse der Wildtyp K-562 (8%) bei Blockierung von MICA mit 10 µg monoklonalem Anti-MICA-Antikörper ist wahrscheinlich durch einen Fehler bei der Messung bedingt. Da es sich bei dem vorliegenden Versuch um ein Einzelexperiment handelt, ist davon auszugehen, dass bei Wiederholung die Wildtyp-K-562 und ULBP4 Transfektanten einer gleichstarken, jedoch im Vergleich zur Isotypkontrolle verringerten Lyse nach Blockierung von MICA unterliegen. MICA/B kann im FACS auf K-562-Zellen nachgewiesen werden (Mizutani, Terasaki et al. 2005; Hanaoka, Kawaguchi et al. 2006). Die Blockierung der Lyse durch anti-MICA bei Wildtyp K-562 deutet darauf hin, dass MICA möglicherweise notwendig für die Ausbildung der Immunologischen-Synapse (IS) ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die ULBP4-Transfektanten von K-562 durch die Oberflächenexpression von ULBP4 zu einer Steigerung der zytotoxischen Aktivität der Zelllinie NKL über den aktivierenden NK-Rezeptor NKG2D führen. Im Gegensatz dazu zeigen die Zelllinie NK92 und B.3NK-Zellen keine gesteigerte Zytolyse gegenüber den Transfektanten. Der aktivierende NK-Rezeptor NKG2D auf NKL-Zellen reagiert offensichtlich sensibler gegenüber diesem Stimulus als die anderen NK-Linien. Die Blockierung der Liganden ULBP1-3 kann durch die Expression von ULBP4 kompensiert werden. Die Blockierung von MICA lässt sich nicht durch die Expression von ULBP4 kompensieren, was einen Hinweis darauf geben könnte, dass MICA möglicherweise notwendig für die Ausbildung der immunologischen Synapse und somit für die Auslösung der Zytolyse ist.

### 1.2 Sezernierung von Zytokinen nach Stimulation aktivierender Rezeptoren auf NK-Zelllinien

Die Freisetzung einer Reihe von Zytokinen und Chemokinen nach Stimulation aktivierender Rezeptoren auf NK-Zellen durch Antikörper gegen die Rezeptoren wurde mittels der Bioplex-Technologie bestimmt. Die gegen die Rezeptoren gerichteten monoklonalen Antikörper wurden an Fc $\gamma$ R-positive murine Zellen (P815) gebunden. Der Fc $\gamma$ -Rezeptor der Mauszellen P815 bindet den Fc-Teil von Antikörpern. Das Verhältnis von NK-Zellen zu P815-Zellen in den Ansätzen betrug 2:1. Die folgenden aktivierenden NK-Rezeptoren wurden über monoklonale Antikörper (200 ng/ml) stimuliert: NKp30, NKp44, NKp46, 2B4 (CD244) und NKG2D. Als Kontrollen diente UPC10 (Negativkontrolle) und der nicht-aktivierende pan-T und NK-Marker CD2. Es wurde die *de novo* Produktion und Sezernierung von IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF von je 40.000 NK-Zellen in einem Volumen von 200  $\mu$ l bestimmt. Neben den NK-Zelllinien NKL, NK92 und B.3NK wurde auch die YT-Linie in Einzelversuchen untersucht. Freigesetzte Zytokin- bzw. Chemokinmengen unterhalb 20 pg/ml wurden als Hintergrund gewertet.

#### Stimulation über 2B4 (CD244) bzw. NKG2D

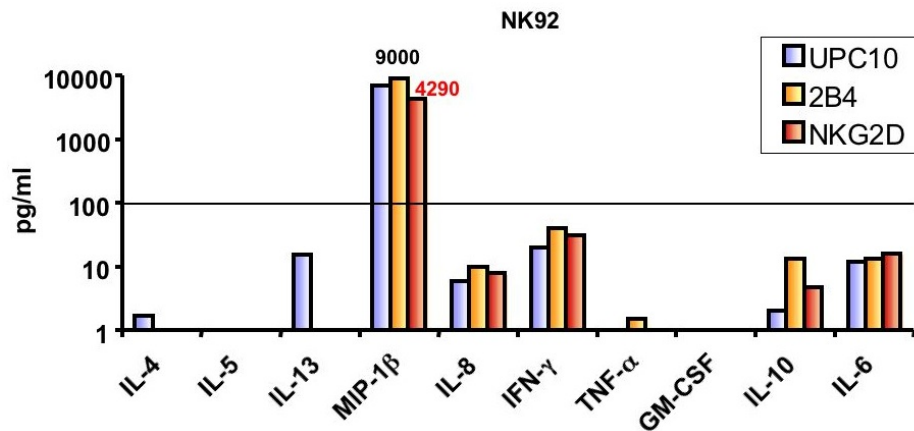


**Abbildung E1.9:** Zytokin-/Chemokin-Sekretion in pg/ml nach Stimulation mit unterschiedlichen Antikörpern auf murinen Fc $\gamma$ <sup>+</sup>-P815-Zellen. YT-Zellen wurden im Verhältnis 2:1 mit Antikörper-gekoppelten P815-Zellen in Duplikaten für 24 h inkubiert und die Überstände anschließend bezgl. der Zytokine quantifiziert.

Wie aus Abbildung E1.9 hervorgeht, sezerniert die humane NK-Leukämie Linie YT überraschenderweise konstitutiv IL-10 in relativ großer Menge (> 2000 pg/ml). Außerdem wird von YT-Zellen konstitutiv IFN- $\gamma$  in geringer Menge (< 150 pg/ml) freigesetzt. Die Sezernierung von IFN- $\gamma$  lässt sich durch Stimulation über den aktivierenden Rezeptor 2B4 (CD244) noch leicht steigern (167 pg/ml), ist aber eher als konstitutiv zu werten. Daneben führt die Stimulation über 2B4 bei der YT zu einer gesteigerten MIP-1 $\beta$ -Freisetzung (393

## E. ERGEBNISSE

pg/ml) im Vergleich zur Isotypkontrolle (55 pg/ml). Die beobachtete Sekretion von IL6, IL-8 und IL-13 (IL-13 nur nach Stimulation über die Isotypenkontrolle UPC10) liegt im Bereich des Hintergrunds (< 20pg/ml).



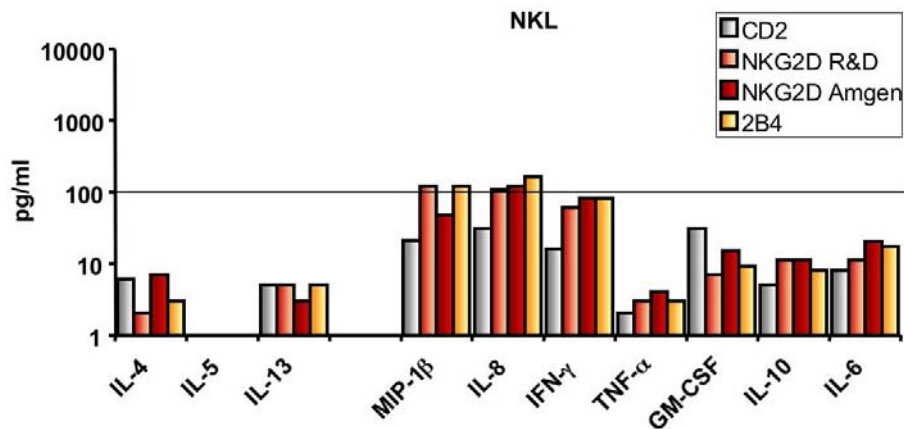
**Abbildung E1.10:** Zytokin-/Chemokin-Sekretion in pg/ml nach Stimulation mit unterschiedlichen Antikörpern auf murinen  $\text{Fc}\gamma^+$ -P815-Zellen. NK92-Zellen wurden im Verhältnis 2:1 mit Antikörper-gekoppelten P815-Zellen in Duplikaten für 24 h kokultiviert und die Überstände anschließend bezgl. der Zytokine quantifiziert.

Die Zelllinie NK92 sezerniert MIP-1 $\beta$  in großer Menge (4000 – 9000 pg/ml). Nach Stimulation über 2B4 (CD244) lässt sich auch bei der NK92 eine gesteigerte Freisetzung von MIP-1 $\beta$  (9000 pg/ml) im Vergleich zur Isotypkontrolle (6700 pg/ml) beobachten (Abbildung E1.10). Interessanterweise führt die Stimulation über NKG2D dagegen zu einer verringerten Freisetzung von MIP-1 $\beta$  (4290 pg/ml) im Vergleich zur Isotypkontrolle. Die Freisetzung von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  liegt, wie bei der YT-Linie im Bereich des Hintergrunds (< 20 pg/ml). IFN- $\gamma$  wird nur sehr schwach konstitutiv exprimiert (< 50 pg/ml). Interessant ist die Freisetzung von geringen Mengen an IL-13 (< 20 pg/ml) bei beiden Zelllinien nach Induktion über die Isotypkontrolle UPC10, die jedoch im Bereich des Hintergrunds liegt. Gao et al. haben gezeigt, dass die Induktion von NK-Zellen durch die Ligation von CD48 (auf B-Zellen) an 2B4 (CD244) auf NK-Zellen zu einer Expression von mRNA für IL-13 in den NK-Zellen führt (Gao, Schwartzberg et al. 2006). Darüber hinaus konnten Hoshino et al. zeigen, dass IL-13 nach Stimulation mit IL-2 von humanen NK-Zellen sezerniert wird und bei Abwesenheit von IFN- $\gamma$  *in vivo* IL-13- und IL-5-produzierende NK-Zellen überwiegen (Hoshino, Winkler-Pickett et al. 1999). Möglicherweise handelt es sich bei der Sezernierung von IL-13 jedoch um einen, durch das Test-Kit verursachten Artefakt, da nur im Ansatz mit UPC10, das als Isotypkontrolle dient, eine Freisetzung zu beobachten ist.

Im Fall der NKL (Abb. E1.11, Seite 85) lässt sich ein „klassisches“ induzierbares NK-Zytokin- bzw. Chemokinfreisetzungsmuster mit der nahezu gleichstarken Sekretion von MIP-1 $\beta$ , IL-8 und IFN- $\gamma$  (im Bereich von 100 pg/ml, Kontrolle im Bereich von 16 - 30 pg/ml) beobachten. IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  sowie GM-CSF werden nur in geringen Mengen im Bereich des

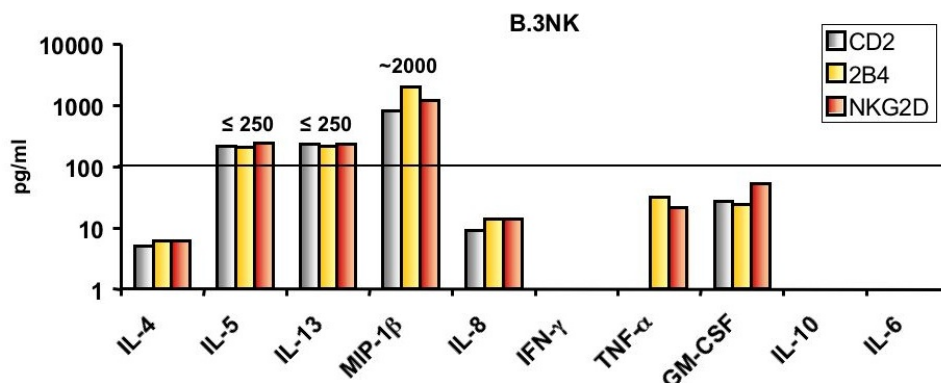
## E. ERGEBNISSE

Hintergrunds (< 20 pg/ml) freigesetzt. Der Vergleich zweier käuflicher Antikörper gegen NKG2D (R&D und Amgen) zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Antikörpern (Abb. E1.11).



**Abbildung E1.11:** Zytokin-/Chemokin-Sekretion in pg/ml nach Stimulation mit unterschiedlichen Antikörpern auf murinen  $Fc\gamma^+$ -P815-Zellen. Die Effektoren NKL wurden im Verhältnis 2:1 mit antikörpergekoppelten P815-Zellen in Duplikaten für 24 Stunden koinkubiert, die Überstände anschließend bzgl. der Zytokine/Chemokine quantifiziert. Es wurden anti-NKG2D-Antikörper verschiedener Hersteller verglichen (R&D, Amgen).

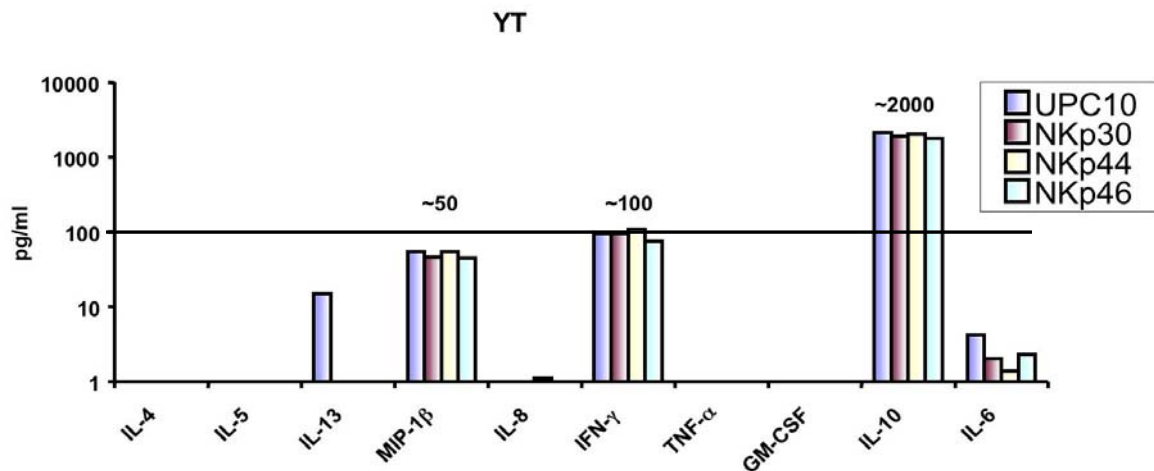
Die B.3NK zeigt ein eher für  $TH_2$ -Zellen typisches Freisetzungsmuster mit konstitutiver Sekretion von IL-5 ( $\leq 250$  pg/ml), IL-13 ( $\leq 250$  pg/ml) und geringer Sekretion von GM-CSF (< 50 pg/ml). Bei den B.3NK-Zellen kann es sich also möglicherweise um die von Hoshino et al. charakterisierten NK-Zellen mit verstärkter IL-5- und IL-13-Sekretion in Abwesenheit von  $IFN-\gamma$  handeln. Die Freisetzung von MIP-1 $\beta$  ist im Fall der B.3NK-Zellen induzierbar. So lässt sich nach Stimulation über 2B4 eine 2,5-fache (798 pg/ml auf 2000 pg/ml) und nach Stimulation über NKG2D eine 1,5-fache Steigerung der Freisetzung von MIP-1 $\beta$  im Vergleich zur Kontrolle (CD2, 798 pg/ml) beobachten.  $TNF-\alpha$  wird nach Stimulation über 2B4 und NKG2D durch die B.3NK-Linie nur in geringen Mengen (< 50 pg/ml) sezerniert (Abb. E1.12).



**Abbildung E1.12:** Zytokin-/Chemokin-Sekretion in pg/ml nach Stimulation mit unterschiedlichen Antikörpern auf murinen  $Fc\gamma^+$ -P815-Zellen. Die Effektoren B.3NK wurden im Verhältnis 2:1 mit antikörpergekoppelten P815-Zellen in Duplikaten für 24 Stunden koinkubiert und die Überstände anschließend bzgl. der Zytokine/Chemokine quantifiziert.

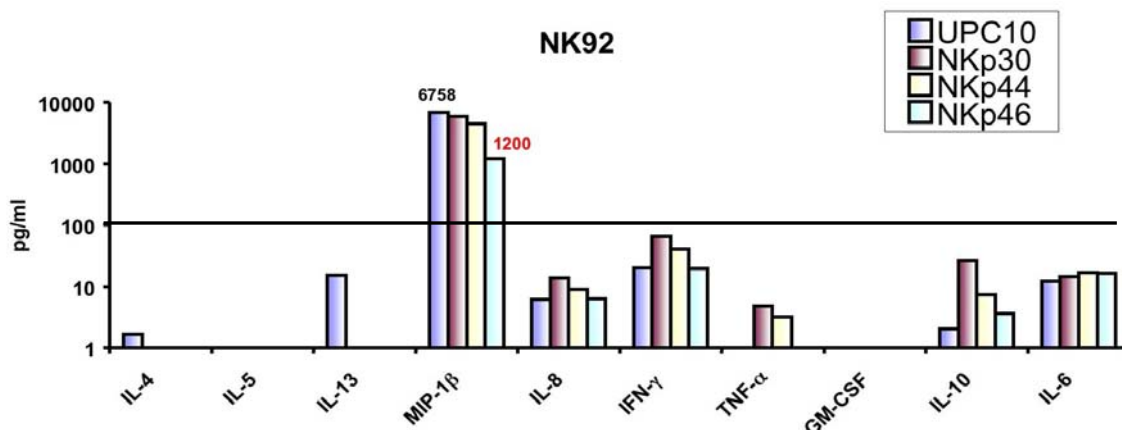
## E. ERGEBNISSE

### Stimulation über die NCRs NKp30, NKp44 und NKp46



**Abbildung E1.13:** Zytokin-/Chemokin-Sekretion in pg/ml nach Stimulation mit unterschiedlichen Antikörpern auf murinen  $\text{Fc}\gamma^+$ -P815-Zellen. Die Effektorzellen YT wurden im Verhältnis 2:1 mit antikörpergekoppelten P815-Zellen in Duplikaten für 24 Stunden koinkubiert und die Überstände anschließend bzgl. der Zytokine/Chemokine quantifiziert.

Die Zelllinie YT lässt sich durch eine Stimulation mit Antikörpern gegen die aktivierenden NCR-Rezeptoren (NKp30, NKp44 und NKp46) nicht in ihrem Zytokinfreisetzungsmuster beeinflussen, was sich auch dadurch erklären lässt, dass diese NCR nur schwach auf der Oberfläche von YT exprimiert sind (Abbildung E1.13 und Tabelle T1.1). Man erkennt die für NK-Zellen eher untypische starke konstitutive Sekretion von IL-10 (~2000 pg/ml). Auch bei diesem Versuch ließ sich eine geringe konstitutive Sekretion von IFN- $\gamma$  (~100 pg/ml) und MIP-1 $\beta$  (~50 pg/ml) nachweisen.

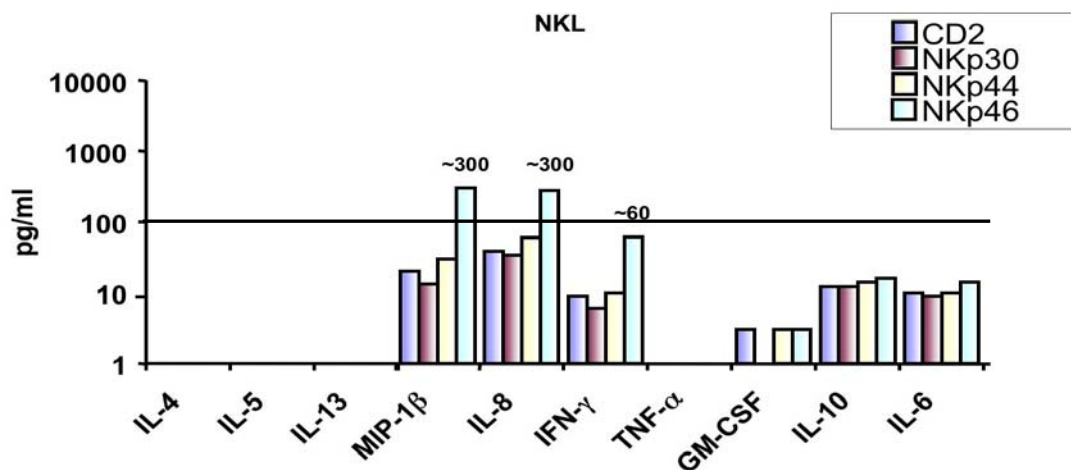


**Abbildung E1.14:** Zytokin-/Chemokin-Sekretion in pg/ml nach Stimulation mit unterschiedlichen Antikörpern auf murinen  $\text{Fc}\gamma^+$ -P815-Zellen. Die Effektorzellen NK92 wurden im Verhältnis 2:1 mit antikörpergekoppelten P815-Zellen in Duplikaten für 24 Stunden koinkubiert und die Überstände anschließend bzgl. der Zytokine/Chemokine quantifiziert.

## E. ERGEBNISSE

Nach Stimulation der NCRs NKp30, NKp44 und NKp46 kommt es bei NK92-Zellen zu einer Abnahme der Freisetzung von MIP1- $\beta$  im Vergleich zur Kontrolle (UPC10, 6758 pg/ml). Diese Abnahme ist bei Stimulation über NKp46 am stärksten zu beobachten (NKp46, 1200 pg/ml). Die Stimulation über die NCRs führt bei der Zelllinie NK92 zu einer allenfalls gering gesteigerten Freisetzung des inflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  (< 100 pg/ml) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung E1.14, Seite 86). Die Freisetzung von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  liegt im Bereich des Hintergrunds (<20 pg/ml).

Die NKL zeigt nach Stimulation des NKp46-Rezeptors im Gegensatz zu den anderen untersuchten NK-Zelllinien eine im Vergleich zur Kontrolle (CD2, < 20 pg/ml) erhöhte Freisetzung von IFN- $\gamma$  (60 pg/ml). Auch die Sezernierung von IL-8 (300 pg/ml) und MIP-1 $\beta$  (300 pg/ml) ist nach Induktion über NKp46 im Vergleich zur Kontrolle (< 50 pg/ml) gesteigert. Die Stimulation über NKp30 und NKp44 führt bei der NKL zu keiner signifikanten Steigerung der Freisetzung von IL-8 und MIP-1 $\beta$ . Die Menge der freigesetzten Zytokine und Chemokine IL-10, IL-6 und GM-CSF liegt im Bereich des Hintergrunds (< 20 pg/ml) (Abbildung E1.15).



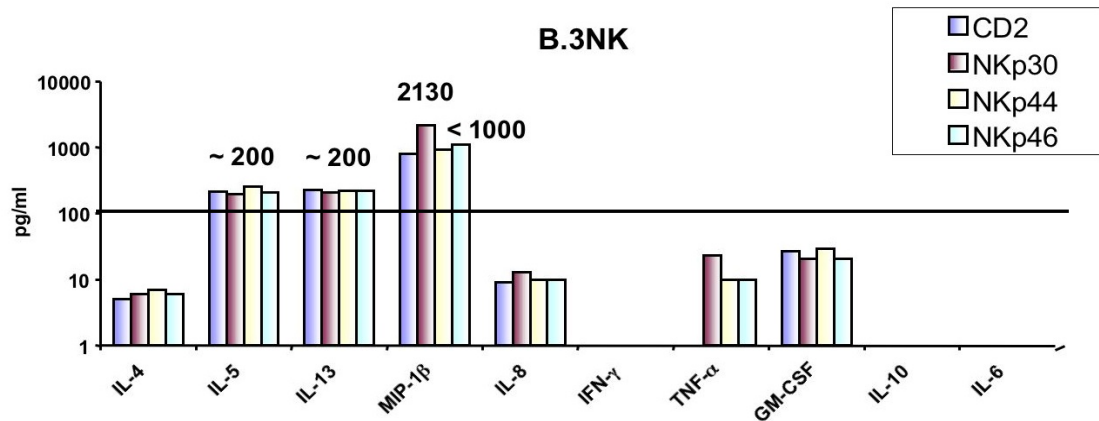
**Abbildung E1.15:** Zytokin-/Chemokin-Sekretion in pg/ml nach Stimulation mit unterschiedlichen Antikörpern auf Polymersphären. NKL-Zellen wurden im Verhältnis 2:1 mit antikörpergekoppelten P815-Zellen in Duplikaten für 24 Stunden inkubiert und die Überstände anschließend bzgl. der Zytokine/Chemokine quantifiziert.

Im Fall der B.3NK zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Stimulation von 2B4 bzw. NKG2D oder den NCRs bezüglich der konstitutiven Sekretion von IL-5 und IL-13 ( $\leq$  250 pg/ml). MIP-1 $\beta$  wird nach Stimulation über NKp30 im Vergleich zur Kontrolle (CD2, 700 pg/ml) vermehrt von der Zelllinie B.3NK in den Überstand sezerniert (2130 pg/ml).



## E. ERGEBNISSE

Die Menge an sezerniertem MIP1- $\beta$  nach Induktion über NKp40 und NKp46 (< 1000 pg/ml) liegt im Bereich der Kontrolle. Die beobachteten Mengen der freigesetzten Zytokine IL-4, IL-8, TNF- $\alpha$  und des Chemokins GM-CSF liegen im Bereich des Hintergrunds (< 20 pg/ml) (Abbildung E1.16).



**Abbildung E1.16:** Zytokin-/Chemokin-Sekretion in pg/ml nach Stimulation mit unterschiedlichen Antikörpern auf murinen Fc $\gamma$ <sup>+</sup>-P815-Zellen. B.3NK wurden im Verhältnis 2:1 mit antikörpergekopplten P815-Zellen in Duplikaten für 24 Stunden koinkubiert und die Überstände anschließend nach Methoden 4.1.2 vermessen. CD2 dient als Kontrolle.

Aus den Untersuchungen der Zytokin- bzw. Chemokinfreisetzungsmuster der Zelllinien NKL, YT, NK92 und der B.3NK-Zellen nach Stimulation verschiedener NK-Rezeptoren lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die genannten Zelllinien ein jeweils spezifisches Freisetzungsmuster besitzen. Die Zelllinie NKL zeigt als einzige untersuchte Linie ein für NK-Zellen typisches, induzierbares Zytokin/Chemokinfreisetzungsmuster. Die Zelllinie YT weicht durch die starke konstitutive Sezernierung von IL-10 vom NK-typischen Muster ab. Die B.3NK-Zellen haben dagegen ein eher für TH<sub>2</sub>-T-Zellen typisches Muster mit Sezernierung von IL-5 und IL-13, wobei sich die MIP-1 $\beta$ -Sezernierung nach Stimulation über die aktivierenden Rezeptoren 2B4 (CD244) und NKG2D noch steigern lässt. Die Zelllinie NK92 sezerniert nur das Chemokin MIP-1 $\beta$  in großen Mengen. Wie bei der B.3NK lässt sich auch bei der NK92 die Sekretion von MIP-1 $\beta$  nach Stimulation über 2B4 noch steigern. 2B4 spielt offensichtlich bei der Freisetzung von MIP-1 $\beta$  eine entscheidende Rolle. Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Plastizität der NK-Zellen nicht nur zu einer unterschiedlichen Ausprägung der zytotoxischen Aktivität einzelner NK-Zellen führt, sondern sich auch in der Freisetzung von Zytokinen bzw. Chemokinen widerspiegelt.



### 1.3 Signaltransduktion in NK-Zellen nach Stimulation mit PMA-Ionomycin und Vergleich mit einer T-Zelllinie

Die Signalübermittlung verläuft in NK-Zellen, ausgehend von den Rezeptoren, über eine Reihe von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen. Viele der aktivierenden NK-Zellrezeptoren weisen keine für die Signaltransduktion notwendigen zytoplasmatischen Domänen auf. Daher kommt es zu einer Assoziation mit Adaptermolekülen, die solche zytoplasmatischen Signaldomänen enthalten (ITAM-Motiv), wie zum Beispiel DAP12, Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  und CD3 $\zeta$ . Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  und CD3 $\zeta$  sind mit NKp30, NKp44, NKp46 und KIR2DL4 assoziiert, Fc $\gamma$ RIIIA (CD16) vermittelt die Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC). Im Fall des aktivierenden Rezeptors NKG2D nimmt DAP10 die Rolle des Adaptermoleküls ein. DAP10 besitzt ein Tyrosin-basiertes Motiv (YINM) im zytosolischen Teil. Allgemein kommt es nach Induktion der aktivierenden Rezeptoren zu einer Phosphorylierung der Adaptermoleküle durch Kinasen, wie beispielsweise Lck und Fyn, die zur SRC-Familie gehören (SFKs).

Der weitere Verlauf der Signaltransduktion umfasst die Kinasen ZAP-70 und Syk, PI3K, Rac und letztendlich einige wichtige Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAP-Kinasen), wie ERK1/2, p38 MAP-Kinase und JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*, JNK). Die MAP-Kinasen sind an den Vorgängen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellbewegung entscheidend beteiligt (Alberola-Ila, Hogquist et al. 1996; Sharp, Schwarz et al. 1997; Sugawara, Moriguchi et al. 1998). In NK-Zellen hängt die TNF- $\alpha$ -Sekretion und die IFN- $\gamma$ -Freisetzung von einem intakten MAP-Kinase/ERK-Signalweg ab (Trotta, Kanakaraj et al. 1996; Mainiero, Gismondi et al. 1998). Das durch seine pleiotrope Wirkung gekennzeichnete Zytokin IL-2 steuert die Proliferation und Aktivierung von NK- und T-Zellen. Der aus mehreren Untereinheiten bestehende IL-2-Rezeptor (IL-2R $\alpha,\beta,\gamma$ ) rekrutiert nach Stimulation zytosolische Kinasen (STAT, JAK), wodurch MAP-Kinase-Signalwege aktiviert werden (Karnitz and Abraham 1996). Die Aktivierung des MAP-Kinase- und ERK-Signalwegs durch IL-2 ist in NK-Zellen aus frischen PBL gezeigt worden (Yu, Caudell et al. 2000). Die mit einer SH2-Domäne ausgestatteten STAT-Kinasen (*signal transducers and activators of transcription*) sind am Signalweg der Zytokinrezeptoren (z.B. über den IL-6-Rezeptor) beteiligt. Nach Phosphorylierung gehen sie in ihre aktive dimere Form über und binden nach Transfer in den Zellkern als Transkriptionsfaktoren an die Promotoren induzierbarer Gene und steuern so deren Transkription.

Eine weitere wichtige Kinase ist die ubiquitäre Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3), welche die Glykogen-Synthase phosphoryliert und dadurch inaktiviert. GSK-3 stellt darüber hinaus

## E. ERGEBNISSE

---

ein wichtiges Element des PIK3-Kinase/Akt Signalwegs dar. Die Phosphorylierung von GSK-3 $\alpha$  an Serin 9 und von GSK-3 $\beta$  an Serin 21 durch Akt führt zur Inhibierung von GSK-3.

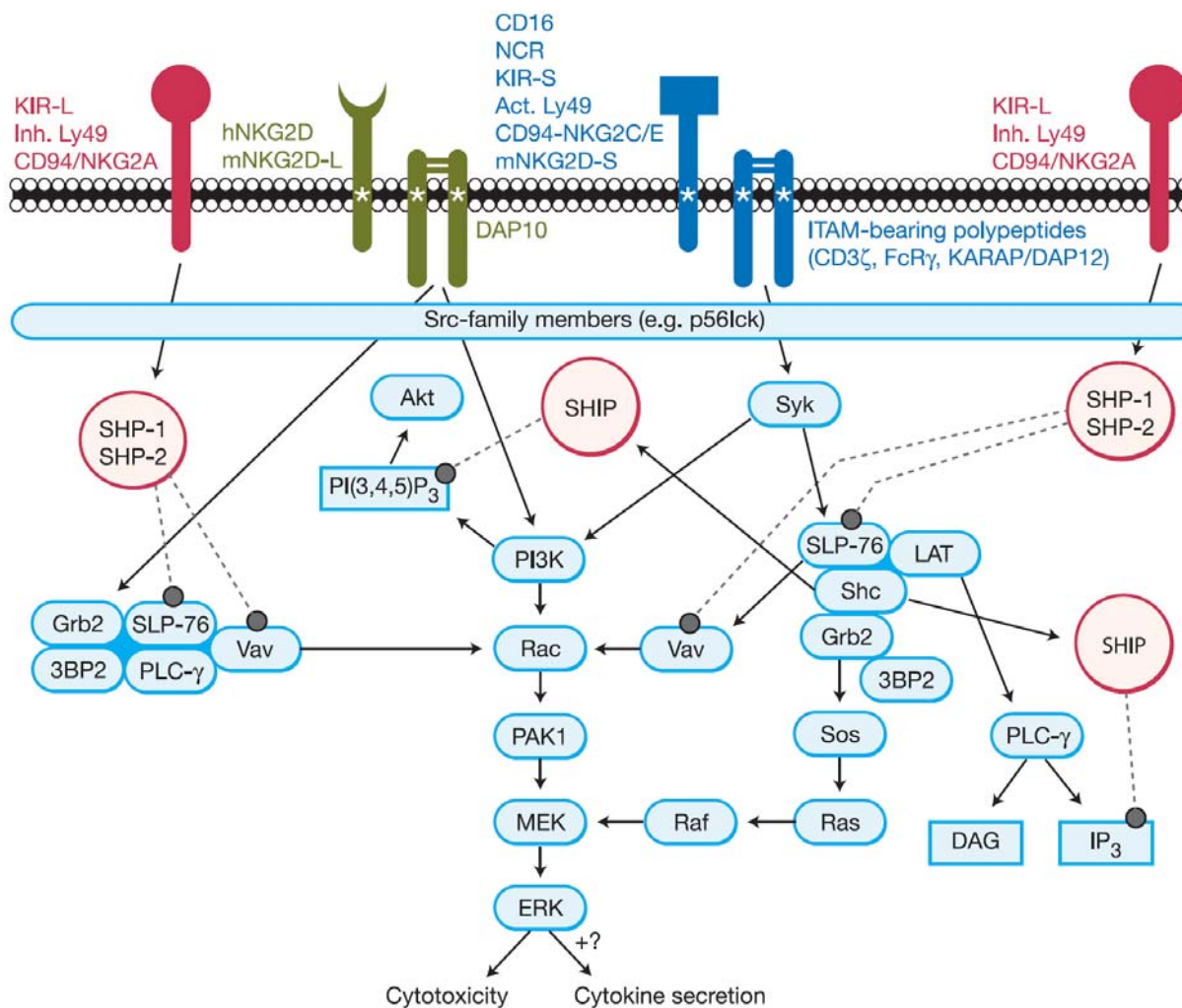
Der Signalweg von 2B4 wird in NK-Zellen über GSK-3 und  $\beta$ -Catenin vermittelt und verläuft über Vav-1, Rac-1, Raf-1, MEK-2 und ERK1/2. Die Inaktivierung von GSK-3, über die Inhibition von GSK-3 $\beta$ , führt zu einer gesteigerten Zytotoxizität und Zytokinsekretion in NK-Zellen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Kinasen führt eine Phosphorylierung von GSK-3 $\alpha/\beta$  zu einer Inaktivierung der Kinase (Aoukaty and Tan 2005). ATF-2 (*Activated Transcription Factor-2*), ein Transkriptionsfaktor, der die Genexpression beeinflusst, wird über MAPK-Kaskaden, eingeschlossen SAPK/JNK und p38 durch Phosphorylierung der Threoninaminosäurereste Thr71 und Thr69 aktiviert. Wachstumsfaktoren können ATF-2 über den Ras-MEK-ERK Signalweg und RalGDS-Src-p38-Signalweg aktivieren (Ouwens, de Ruiter et al. 2002). Im Mausmodell hat sich gezeigt, dass eine transgene Insertion in das *Atf2*-Gen zu einer Verminderung der Zahl der NK-Zellen führt und damit auf eine Beteiligung von ATF-2 an den Vorgängen während der NK-Zellentwicklung hinweist (Kim, Song et al. 2006).

I $\kappa$ B $\alpha$  ist ein inhibitorisches Protein, das den am Zellwachstum und Differenzierung beteiligten Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B inhibiert. Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B-Proteinen führt zu deren Ubiquitinierung und anschließendem Abbau des Proteins. Die I $\kappa$ B-Proteine werden nach Bindung von Zytokinen an Rezeptoren schnell phosphoryliert.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollten mittels der neuartigen Multiplex-Technologie im Vergleich zum herkömmlichen Western-Blot-Verfahren phosphorylierte Kinasen in NK-Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin nachgewiesen werden.

## E. ERGEBNISSE

Darüber hinaus sollten die charakterisierten NK-Zelllinien und eine T-Zelllinie (Jurkat) in Bezug auf die Phosphorylierung von Kinasen miteinander verglichen werden. Die Aufarbeitung der Proben und Durchführung der Versuche erfolgte wie in Methoden 4.2 beschrieben. Der Phorbol ester PMA (Phorbol 12-Myristat-13-Acetat) aktiviert *in vitro* und *in vivo* die Proteinkinase C (Estensen 1984), die eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion einnimmt. Ionomycin ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor und erhöht die Konzentration an zytosolischem Calcium, dass als „second-messenger“ wirkt. Die nachfolgende Abbildung (E1.17) zeigt eine Übersicht über die Signaltransduktion in NK-Zellen.



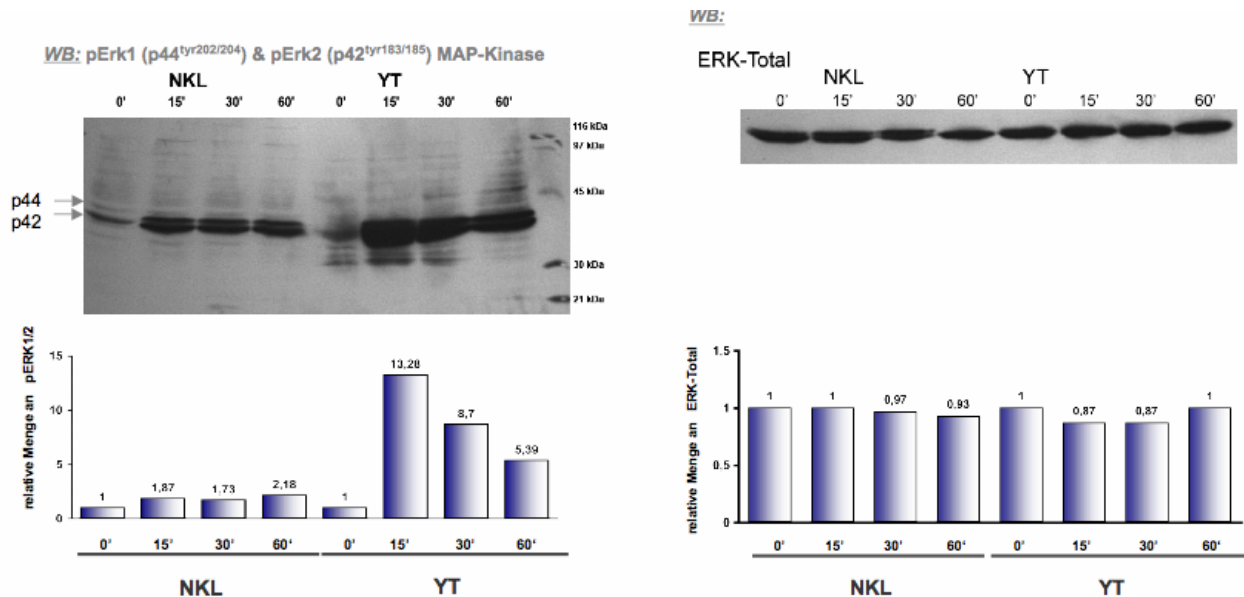
**Abbildung E1.17:** Schematische Darstellung der Signaltransduktion in NK-Zellen (Vivier, Nunes et al. 2004).

### 1.3.1 Stimulation der charakterisierten NK-Zelllinien mit PMA-Ionomycin und Auswirkung auf die Phosphorylierung wichtiger Kinasen

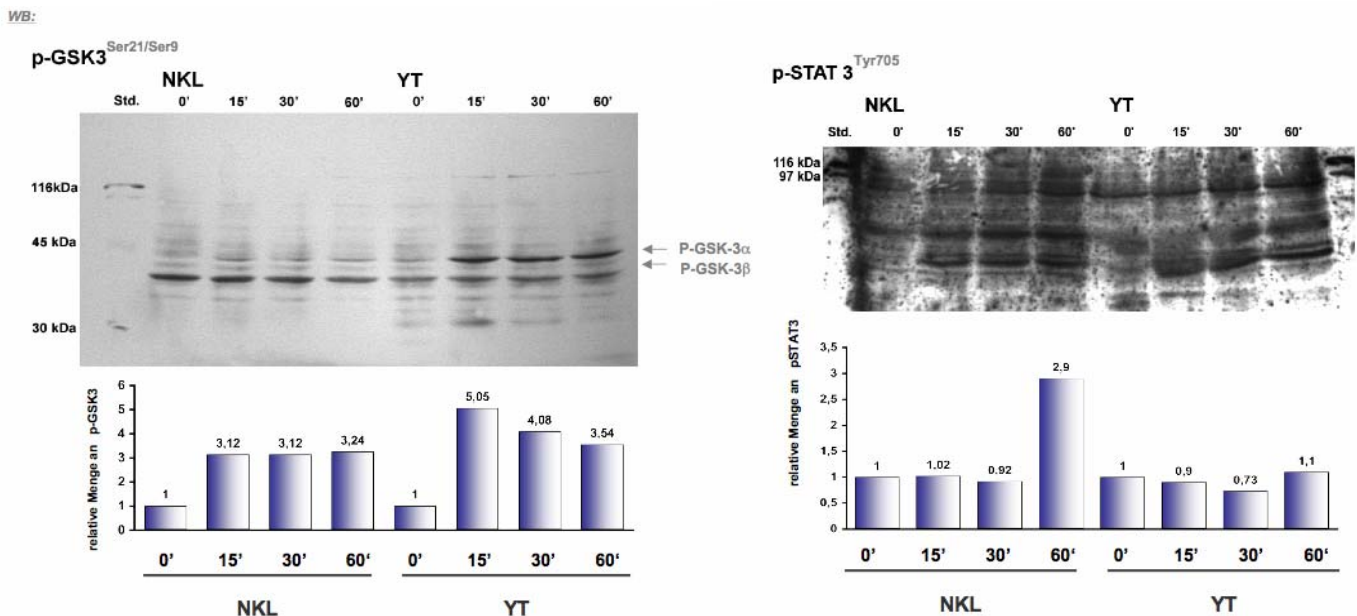
Die NK-Zelllinien NKL, NK92, YT und B.3NK wurden mit PMA-Ionomycin stimuliert und die Stimulation an festgelegten Zeitpunkten gestoppt (0, 15, 30, 60 Minuten).

## E. ERGEBNISSE

Die anschließend gewonnenen Zelllysate wurden mittels der Multiplex-Technologie und mit Hilfe der Western-Blot-Analyse auf das Vorliegen phosphorylierter Kinasen untersucht.



**Abbildung E1.18a:** Nachweis des Phosphorylierungszustands der ERK1- und ERK2-MAP-Kinasen aus Lysaten der NK-Zelllinien NKL und YT nach Abstoppen der Stimulation mit PMA-Ionomycin an spezifischen Zeitpunkten (0', 15', 30', 60') durch Western-Blot und Multiplex-Verfahren im Vergleich zu phosphoryliertem Gesamt-ERK-Protein (Kontrolle der identischen Menge an phosphoryliertem Protein zu jedem Zeitpunkt). Die relative Menge an phosphorylierter Kinase wurde bei der Multiplex-Technologie als Zunahme in Vergleich zum Basalwert (Zeitpunkt 0 Minuten Stimulation) berechnet.



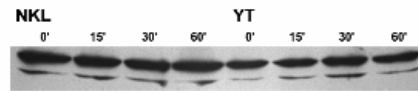
**Abbildung E1.18b:** Nachweis des Phosphorylierungszustands der GSK3 $\alpha/\beta$ - und STAT3-Kinasen aus Lysaten der NK-Zelllinien NKL und YT nach Stimulation mit PMA-Ionomycin an spezifischen Zeitpunkten (0', 15', 30', 60') durch Western-Blot und Multiplex-Verfahren. Die relative Menge an phosphorylierter Kinase wurde bei der Multiplex-Technologie als Zunahme in Vergleich zum Basalwert (Zeitpunkt 0 Minuten Stimulation) berechnet.

## E. ERGEBNISSE

WB:

### Total-STAT 3

STAT-Total

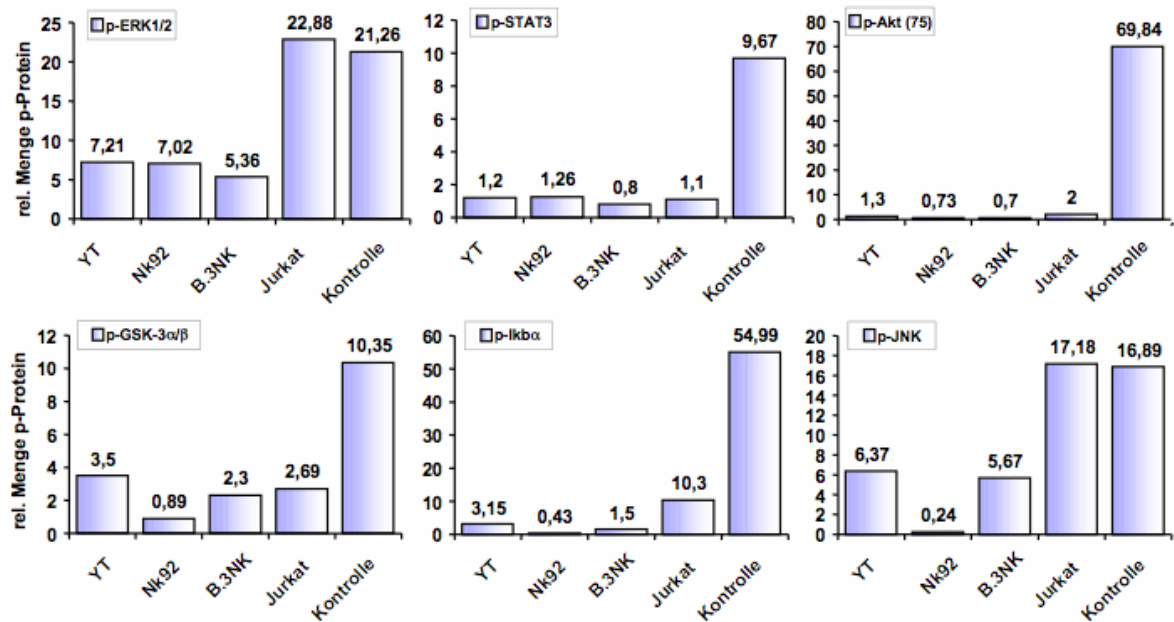


**Abbildung E1.18c:** Western-Blot-Analyse des phosphorylierten Gesamtproteins STAT3 als Kontrolle der identischen Proteinmenge bei allen Ansätzen.

Wie aus dem Balkendiagramm in Abbildung E1.18a (Seite 92) hervorgeht, kommt es bei der Zelllinie NKL nach Induktion durch PMA-Ionomycin zu einer maximal 2-fachen Steigerung der Phosphorylierung von ERK1/ERK2 im Vergleich zur Hintergrundphosphorylierung (Zeitpunkt 60 Minuten). Dies deckt sich mit der Beobachtung aus dem Western-Blot, wobei hier die Steigerung deutlicher sichtbar zu sein scheint. YT zeigt hingegen nach einer schnellen und starken Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (13-fache Steigerung im Vergleich zum Basalwert) zum Zeitpunkt 15' eine rasche Abnahme des Phosphorylierungsgrades nach längerer Induktion durch PMA-Ionomycin (Zeitpunkte 30' und 60'). Das lässt darauf schließen, dass nach einer starken Induktion des Signalwegs dieser bei anhaltendem Stimulus wieder abgeschaltet wird, um eine Überaktivierung zu verhindern. Im Fall von GSK-3 $\alpha/\beta$  (Abbildung E1.18b, Seite 92) kommt es bei NKL nach Stimulation für 15 Minuten zu einer anhaltenden Phosphorylierung dieser Serine/Threonin-Kinase. Die durch das Multiplex-Verfahren gewonnenen Werte zeigen eine bis zu 3-fache Steigerung der Menge an p-GSK-3 $\alpha/\beta$  nach Stimulation. Dieses Bild fällt im Western-Blot weniger deutlich aus. Das kann durch die größere Empfindlichkeit des Multiplex-Verfahrens begründet sein. YT zeigt im Fall von GSK-3 $\alpha/\beta$  ein ähnliches Bild wie bei den MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, d.h. nach einer anfänglichen ( $t = 15$  Minuten) Steigerung der Menge an p-GSK-3 $\alpha/\beta$  um das 5-fache im Vergleich zum Basalwert folgt eine stetige Abnahme der Menge an phosphorylierter GS-Kinase 3 mit zunehmender Stimulationsdauer. Die Aussage der Multiplex-Ergebnisse deckt sich gut mit dem Western-Blot (Abbildung E1.18b). Im Fall von p-STAT3 lässt sich bei der NKL-Zelllinie nach 60 Minuten Stimulation eine Steigerung der Menge an phosphorylierter STAT3-Kinase beobachten. YT zeigt bei STAT3 keine Zunahme des Phosphorylierungsgrades nach Stimulation mit PMA-Ionomycin (Abbildung E1.18b, rechts). In Abbildung E1.18c ist als Kontrolle die Gesamtmenge an phosphoryliertem STAT3 im Western-Blot gezeigt (Total-STAT3).

In einem weiteren Versuch wurde die Phosphorylierung verschiedener Kinasen und Transkriptionsfaktoren nach Stimulation für 15 Minuten mit PMA-Ionomycin in unterschiedlichen NK- und einer T-Zelllinie (Jurkat) miteinander verglichen. Der Versuch wurde wie in Methoden 4.2 beschrieben durchgeführt.

## E. ERGEBNISSE



**Abbildung E1.19:** Vergleich der relativen Menge phosphoryliertem Proteins (Kinasen,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ) nach 15' Stimulation mit PMA-Ionomycin in verschiedenen NK-Linien (YT, NK92, B.3NK) mit einer T-Zelllinie (Jurkat). Gezeigt ist die Zunahme an phosphoryliertem Protein in Bezug auf den jeweiligen Basalwert der Zelllinie und die Positivkontrolle (Kontrolle)

Aus Abbildung E1.19 geht hervor, dass die maligne T-Zelllinie Jurkat im Vergleich zu den NK-Zelllinien nach Stimulation eine erhöhte Menge an p-ERK1/2 (22-fach) und p-JNK (17-fach) aufweist. Daneben wird nach Stimulation mit PMA-Ionomycin in Jurkat vermehrt  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  phosphoryliert. Die NK-Zelllinien YT und B.3NK weisen ein zueinander ähnliches Bild der Phosphorylierung der untersuchten Proteine auf. In Bezug auf GSK-3 $\alpha/\beta$ ,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  und JNK wird die NK92-Linie im Vergleich zu den anderen NK-Linien weniger stark durch PMA-Ionomycin stimuliert. Die Kinase Akt(75) scheint nach Stimulation durch PMA/Ionomycin in den NK-Zellen nicht phosphoryliert zu werden.

Zusammenfassend lässt sich auch im Fall der Signaltransduktion die große Plastizität von NK-Zellen zeigen. Durch die Untersuchung des Phosphorylierungszustands verschiedener Kinasen und des Transkriptionsfaktorinhibitors  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  in verschiedenen NK-Zelllinien und einer malignen T-Zelllinie konnte ich zeigen, dass sich die Signaltransduktion nach identischem Stimulus in verschiedenen etablierten NK-Zelllinien voneinander unterscheidet. So zeigten z.B. die NKL- und die YT-Zelllinie eindeutige Unterschiede in der Kinetik und Stärke der Phosphorylierung wichtiger Signalkaskadekinasen nach Induktion (pERK1/2 und p-STAT3). Darüber hinaus konnte bei der Zelllinie NK92 ein nur geringer Phosphorylierungsstatus nach Stimulation im Vergleich zu den anderen Linien beobachtet werden. Die T-Zelllinie Jurkat weicht insbesondere im Fall von p-JNK und  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  und im Ausmaß der Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK von den NK-Zelllinien ab. Das Phosphoplex-Verfahren eignet sich gut zur Untersuchung der Signaltransduktion in NK-Zellen nach Stimulation und deckt sich mit den Ergebnissen der herkömmlichen Western-Blot-Analyse.

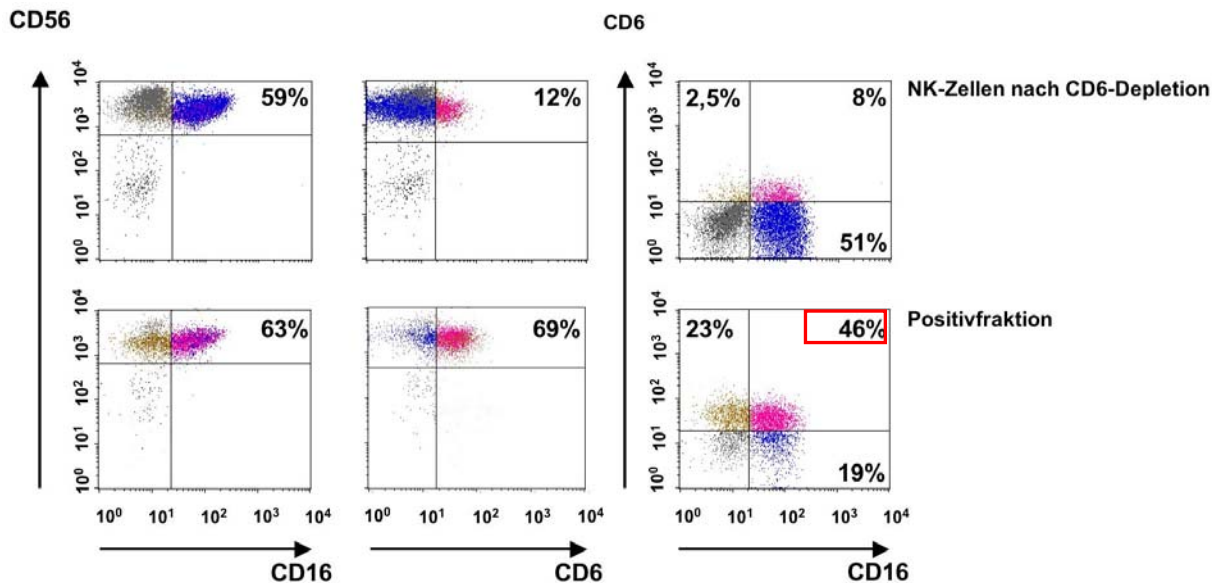
### **1.4 Expressionsmuster von CD6 und Depletion des CD6<sup>+</sup>-NK-Zell-Kompartiments aus PBL eines Normalspenders**

Im Zuge einiger detaillierter phänotypischer Untersuchungen an Normalspendern wurde deutlich, dass eine Subpopulation von NK-Zellen zusammen mit dem Großteil der T-Zellen der Spender das Molekül CD6 exprimieren. Deshalb sollte vor Beginn der funktionellen Untersuchungen des HSZT-Spendermaterials mit Hilfe von PBL aus Normalspendern der Einfluss einer CD6-Depletion auf die NK-Funktion bestimmt werden. Dazu wurden ca.  $180 \times 10^6$  PBL-Zellen eines gesunden Normalspenders (RK) einer negativen NK-Isolierung nach Dynal<sup>®</sup> unterzogen (Methoden 2.9.2.1). Die negative NK-Isolierung basiert auf der Depletion aller Nicht-NK-Zellen durch Antikörper (CD3, CD14, CD36, CDw123, HLA-Klasse-II-DR/DP, CD235a [Glykophorin a]), die an magnetischen Mikrosphären gebunden sind. Dadurch konnten  $19 \times 10^6$  NK-Zellen isoliert werden, mit nur geringer Verunreinigung durch T-Zellen (ca. 8 % der Gesamtzellzahl). Diese NK-Zellen wurden in RPMI III + 10% HS und 300 Einheiten IL-2 für 14 Tage in Kultur genommen und davon  $2,8 \times 10^6$  Zellen mittels des magnetischen AutoMACS-Sorters und CD6-MicroBeads CD6-depletiert (Methoden 2.9.2.2). Um die isolierten NK-Zellen zu expandieren, wurden sie eine weitere Woche mit IL-2 stimuliert. Dies führt zu einer erhöhten CD56-Expression, die mit einer Aktivierung der NK-Zellen einhergeht. Durch die AutoMACS-Depletion konnte eine  $0,7 \times 10^6$  Zellen umfassende CD6-depletierte NK-Fraktion (NK-Zellen nach CD6-Depletion) und eine  $0,2 \times 10^6$  Zellen umfassende CD6<sup>+</sup>-NK-Fraktion (Positivfraktion) erzeugt werden (32% Ausbeute der



## E. ERGEBNISSE

eingesetzten NK-Zellen, 68% Verlust). Die so erhaltenen Fraktionen wurden in einer FACS-Analyse auf die Expression von CD16, CD6 und CD56 untersucht.



**Abbildung E1.20:** FACS-Analyse der beiden, durch AutoMACS und CD6-MicroBeads erhaltenen NK-Fraktionen aus isolierten NK-Zellen eines Normalspenders. Färbung mit CD56-APC, CD16-FITC und CD6-PE. Es wurde auf lebende Zellen im FSC-H/SSC-H eingestellt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Prozentsatz Zellen im gezeigten Quadranten bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen im Gate.

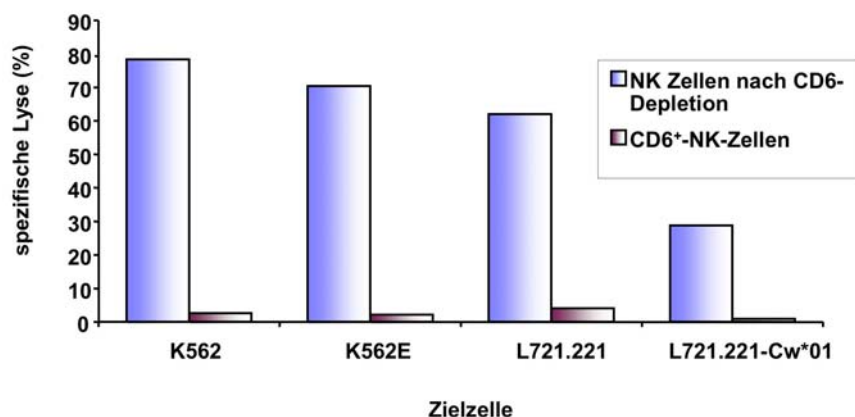
Aus Abbildung E1.20 geht hervor, dass alle NK-Zellen bis auf einen kleinen Teil (ca. 2%) durch die IL-2 bedingte Expansion einen prominenten CD56-Phänotyp besitzen. In der CD6-depletierten NK-Fraktion verbleiben, bezogen auf die Gesamtzahl an Zellen im Gate, ca. 12% CD56<sup>+</sup>CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen. Von den depletierten CD56<sup>+</sup>CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen lassen sich nur 69% in der Positivfraktion nachweisen. Zusammen mit den CD56<sup>+</sup>CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen in der CD6-depletierten Fraktion (12%) ergibt sich also insgesamt ein Verlust von 19% der NK-Zellen durch das Depletionsverfahren. Der Prozentsatz CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>-NK-Zellen ist in beiden Fraktionen nahezu identisch (59% in der CD6-depletierten Fraktion und 63% in der Positivfraktion, jeweils bezogen auf alle Zellen im Gate). Weiter kommt es durch die CD6-Depletion zu einer Anreicherung vornehmlich CD16<sup>+</sup>CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen in der Positivfraktion (46%, roter Rahmen, Abb. E1.20). Das Verhältnis von CD16<sup>+</sup>CD6<sup>+</sup> zu CD16<sup>-</sup>CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen beträgt in der Positivfraktion 2:1 und in der CD6-depletierten Fraktion (NK-Zellen nach CD6-Depletion) ca. 3:1. Die Hälfte der Zellen, die der CD6-Depletion unterliegen zeigt also einen CD16-positiven Phänotyp. Daraus lässt sich schließen, dass die meisten CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen CD16 exprimieren. Da alle beobachteten NK-Zellen eine starke CD56-Expression aufgrund der IL-2-Stimulation zeigten und damit eine Zuordnung zur CD56<sup>bright</sup>- bzw. CD56<sup>dim</sup>-Fraktion der NK-Population nicht möglich ist, kann nur die Vermutung angestellt



## E. ERGEBNISSE

werden, dass sich die NK-Population in PBL gesunder Spender aufgrund der CD6-Expression und der CD16-Expression einteilen lässt. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass CD6 möglicherweise ein differentieller Marker für NK-Zellen ist.

Die beiden durch die Depletion gewonnenen Fraktionen wurden in einem Chromfreisetzungstest gegen unterschiedliche Zielzellen eingesetzt. Dazu wurde die CD6-depletierte Fraktion (NK-Zellen nach CD6-Depletion, Abb. E1.20) in einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis (E:T) von 25:1 und die Fraktion der CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen (Positivfraktion, Abb. E1.20) in einem E:T-Verhältnis von 10:1 eingesetzt. Als Zielzellen dienten K-562-Zellen und eine HLA-E-Transfektante von K-562 (K-562-E(2B4)) sowie L721.221 Zellen und eine HLA-C-Transfektante (L721.221-Cw\*01).



**Abbildung E1.21:** spezifische Lyse verschiedener Zielzellen durch CD6-depletierte NK-Zellen (NK-Zellen nach CD6-Depletion, Effektor:Zielzell-Verhältnis = 25:1) und CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen (Effektor:Zielzell-Verhältnis = 10:1).

Man erkennt in Abbildung E1.21 eine starke Lyse der Zielzellen durch CD6-depletierten NK-Zellen, wobei trotz CD94/NKG2A-Expression der NK-Zellen (Daten nicht gezeigt) keine Abschaltung über HLA-E im Fall der K-562-E-Transfektante zu beobachten ist. Hierbei handelt es sich um ein häufig beobachtetes Phänomen, bei dem NK-Zellen nach Aktivierung über IL-2 trotz Bindung von HLA-E an den inhibitorischen CD94/NKG2A-Rezeptorkomplex keiner Abschaltung in Bezug auf die Zytotoxizität unterliegen. Im Vergleich zur L721.221 führt die L721.221-Cw\*01-Transfektante zu einer Abschaltung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen aus der CD6-depletierten Fraktion. Dies korrelierte mit dem Prozentsatz p58.2-positiver NK-Zellen des Spenders (Daten nicht gezeigt), die den Cw\*01-spezifischen inhibitorischen KIR-Rezeptor exprimieren. Interessanterweise zeigen die CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen (Positivfraktion) im Gegensatz dazu nahezu keine zytotoxische Aktivität gegenüber den Zielzellen. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch die Bindung der anti-CD6-Antikörper an die

## E. ERGEBNISSE

---

Zellen und die mechanische Belastung bei der Depletion über magnetische Mikrosphären, die sich negativ auf die Funktionalität auswirken.

In einem Experiment konnte die NK-Zellfraktion des peripheren Blutes durch negative NK-Isolierung gewonnen und diese durch IL-2 Stimulation expandiert werden. Die NK-Zellen konnten anschließend mittels magnetischer Mikrosphären und anti-CD6-Antikörper CD6-depletiert werden. Dadurch konnten zwei unterschiedliche NK-Subpopulationen isoliert werden, die sich anhand der Expression von CD6 und CD16 voneinander unterscheiden lassen. Die depletierten CD6-positiven NK-Zellen sind dabei größtenteils CD16-positiv.

Daneben konnte ich zeigen, dass die beiden isolierten NK-Subpopulationen voneinander abweichende zytotoxische Wirkung gegenüber verschiedenen Zielzellen besitzen. Die CD6<sup>+</sup>-Population zeigte dabei eine stark verminderte zytotoxische Aktivität gegenüber Zielzellen, im Vergleich zur CD6-negativen NK-Zellfraktion. Dieser Effekt kann jedoch durch das Depletionsverfahren bedingt sein.

### **2. Relevanz der Natürlichen Killerzellen bei der haploidentischen Knochenmark- und Stammzelltransplantation**

Im Zuge der haploidentischen Stammzelltransplantation nach dem Protokoll von Prof.Dr. Hans-Jochem Kolb werden im Mittel  $22 \times 10^6$  (  $n = 106$ , Bereich  $3 - 65 \times 10^6$  ) NK-Zellen pro Kilogramm Körpergewicht zusammen mit Stammzellen (CD34<sup>+</sup>, Mittelwert:  $11 \times 10^6$ ,  $n = 106$ , Bereich:  $1 - 35 \times 10^6$ ), B-Zellen und wenigen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (CD4<sup>+</sup> Mittelwert:  $4 \times 10^6$ ,  $n = 106$ , Bereich:  $0,05 - 65 \times 10^6$  ) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Mittelwert:  $8 \times 10^6$ ,  $n = 106$ , Bereich:  $0,12 - 45 \times 10^6$  ) nach T-Zelldepletion transplantiert (Daten der Klinischen Medizin). Dafür wird nach G-CSF-Mobilisierung der Stammzellen des Spenders aus dem Knochenmark in die Peripherie und Leukapharese das PBSC-Präparat (periphere Blutstammzellen, PBSZ) gewonnen und durch CD6-Depletion T-Zell-depletiert (97 – 99% Depletion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen). Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, inwieweit neben T-Zellen auch andere Lymphozyten/Leukozyten von der Depletion betroffen sind.

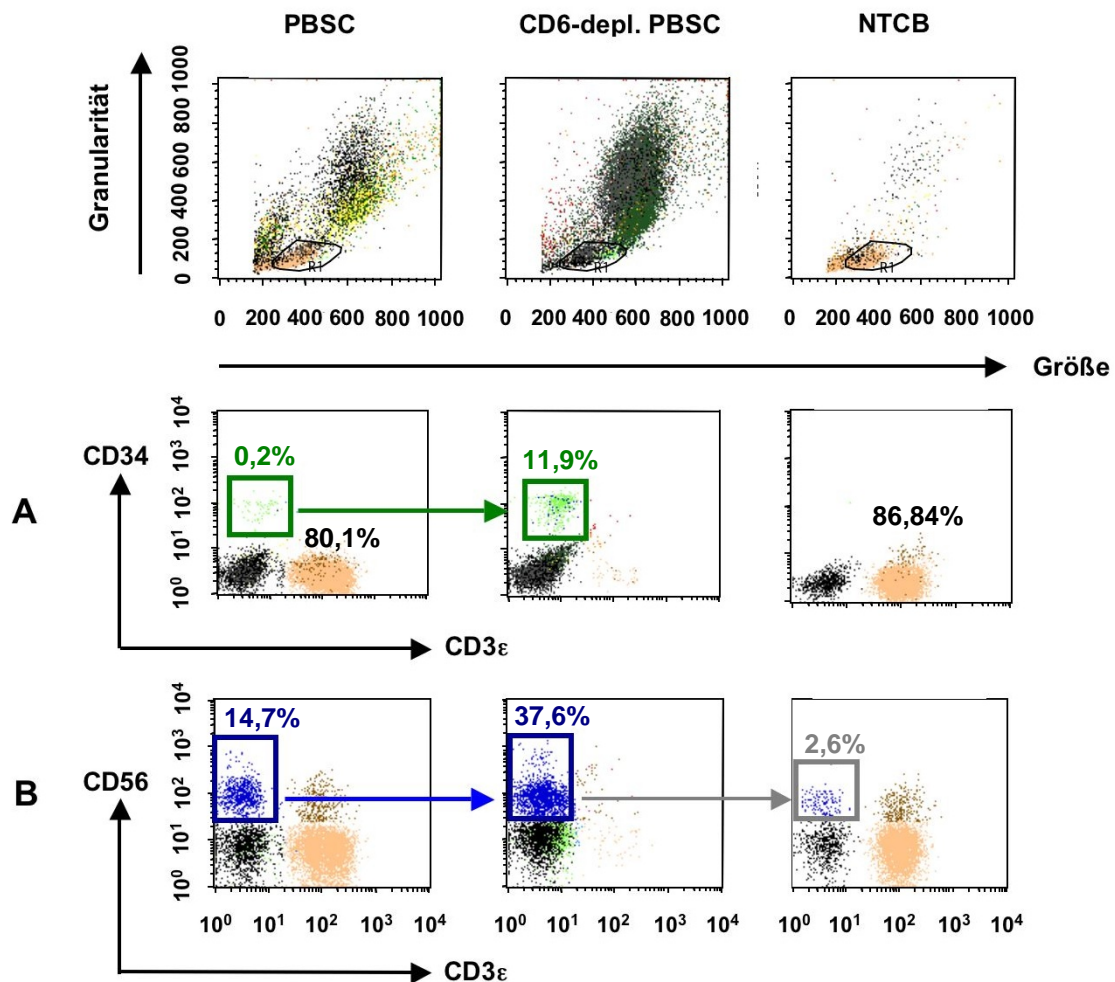
#### **2.1 Depletion von T-Zellen und einer Gruppe von NK-Zellen, Anreicherung hämatopoetischer Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) durch Depletion mittels monoklonaler anti-CD6-Antikörper**

Durch die vorliegende Arbeit sollte erstmals eine genaue Untersuchung des Phänotyps der bei der haploidentischen Stammzelltransplantation transplantierten NK-Zellen erfolgen und die Funktion der im Transplantat verbleibenden NK-Zellen bestimmt werden. Die

## E. ERGEBNISSE

Transplantationseinheit der III. Medizinischen Klinik der LMU stellte dafür Proben der PBSC-Präparate, der CD6-depletierten PBSC (CD6-depl.) und der CD6<sup>+</sup>-Fraktion nach Depletion (NTCB, *non-target-cell-bag*) von insgesamt 36 Spendern zur Verfügung.

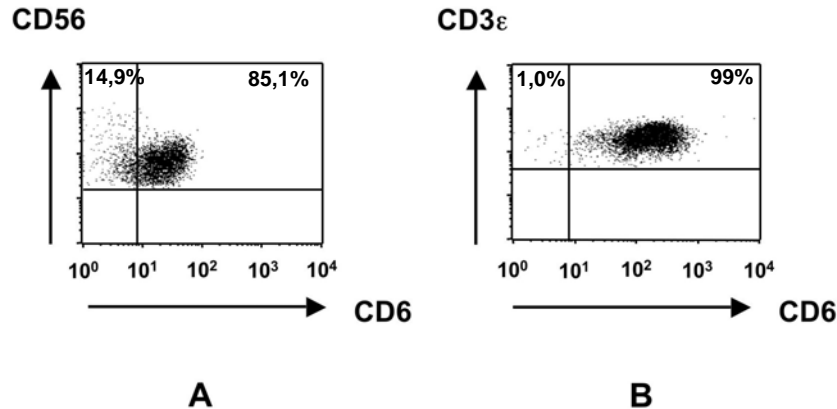
Die Präparate (PBSC, CD6-depl. PBSC, NTCB) wurden wie in Methoden 2.2 beschrieben aufgearbeitet und einer 4-Farben-FACS-Analyse unterzogen (siehe Anhang Tabelle I.3 für die getesteten Kombinationen der Fluoreszenz-markierten Antikörper).



**Abbildung E2.1:** FACS-Analyse des PBSC-, CD6-depletierten PBSC- und NTCB-Präparats eines exemplarischen Spenders (11D). Es wurde auf lebende Lymphozyten eingestellt und anschließend im Sinne der Bool'schen Algebra durch die CellQuest-Software für die unterschiedlichen Populationen verschiedene Farben zugeteilt. Von links nach rechts sind spaltenweise das PBSC-, CD6-depletierte-PBSC- und NTCB-Präparat abgebildet. A: CD34-FITC-Färbung gegen CD3ε-Färbung (PerCP). Man erkennt eine Anreicherung von CD34<sup>+</sup>, CD3ε<sup>-</sup> Stammzellen im CD6-depletierten-PBSC-Präparat im Vergleich zum undepletierten PBSC (grüne Rahmen in Abbildung E2.1). B: Durch die CD6-Depletion des PBSC kommt es zu einer nahezu vollständigen Verringerung der T-Zellen (aprikotfarbene Zellen) und gleichzeitig zu einer Verringerung CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen, die sich im NTCB wieder finden (grauer Rahmen in Abbildung E2.1, B).

## E. ERGEBNISSE

Abbildung E2.1 (Seite 99) zeigt ein stellvertretendes Beispiel der Phänotyp-FACS-Analyse des PBSC-, CD6-depletierten-PBSC- und NTCB-Präparats eines Spenders (11D). Man erkennt eine Anreicherung von  $CD34^+$ -Zellen (A: grüner Rahmen in Abbildung E2.1) im CD6-depletierten PBSC. Gleichzeitig kommt es durch die CD6-Depletion der T-Zellen zu einer Anreicherung von NK-Zellen (B: blauer Pfeil) und zu einer Depletion einer NK-Subpopulation, die offensichtlich  $CD6^+$  ist (B: grauer Pfeil). Diese  $CD6^+$ -NK-Zellen befinden sich nach CD6-Depletion in der Positiv-Fraktion, dem sogenannten Non-target-cell-bag (NTCB) ( $CD6^+$ -NK-Zellen: grauer Rahmen in Abbildung E2.1, B). Die CD6-Depletion, die der Entfernung alloreaktiver T-Zellen zur Verhinderung einer GvHD dient, führt also durch eine CD6-Expression auf einer Subpopulation von NK-Zellen auch zur Modulation des NK-Repertoires. Dieser Effekt wurde bei allen 36 untersuchten Spenderpräparaten beobachtet, wobei die Zahl der transplantierten NK-Zellen und damit die Menge der depletierten  $CD6^+$ -NK-Zellen von Spender zu Spender unterschiedlich war (nicht gezeigt). Mit der Beobachtung, dass durch den CD6-Marker nicht nur der Großteil der T-Zellen, sondern auch NK und B-Zellen depletiert wurden, eröffnete sich eine völlig neue Perspektive bezüglich der Relevanz des CD6-Markers für die Modulation der transplantierten Leukozyten. Die Veränderung des NK-Repertoires war deshalb von großem Interesse, weil sich hier die Frage nach den Eigenschaften der betroffenen Subpopulation stellte.

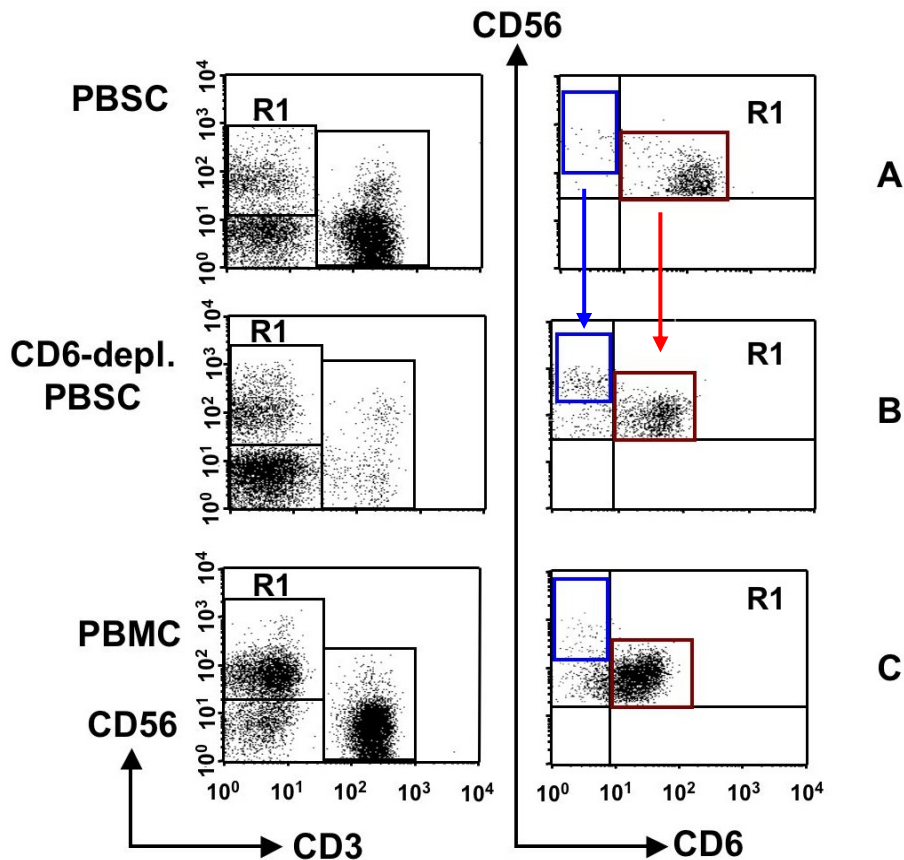


**Abbildung E2.2:** Stellvertretendes FACS-Bild der CD6-Expression auf NK-Zellen (A) und T-Zellen (B) eines Normalspenders.

Abbildung E2.2 zeigt exemplarisch die Expression von CD6 auf NK-Zellen ( $CD56^+$ ) und T-Zellen ( $CD3\epsilon^+$ ) einer PBL-Probe eines Normalspenders (CF). Im folgenden Abschnitt wird detailliert auf die verschiedenen Subpopulationen eingegangen.

## 2.2 CD6 als differentieller Marker auf NK-Zellen

Im Zuge dieser Arbeit sollte die Oberflächenexpression von CD6 auf NK-Zellen genauer beschrieben werden. Koopman et al. konnten zwar zeigen, dass mRNA für CD6 in CD56<sup>dim</sup>-Zellen des peripheren Bluts exprimiert wird (Koopman, Kopcow et al. 2003), die exakte Verteilung der NK-Zellen bezüglich der verschiedenen NK-Marker und CD6 wurde jedoch noch nicht beschrieben. Für die Oberflächenanalyse wurden T- und NK-Zellen aus PBMC von Normalspendern und aus PBSC und CD6-depletierten PBSC der Spender für die HSZT mittels FACS-Analyse auf die Expression von CD6 untersucht.



**Abbildung E2.3:** Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse des (A) PBSC- und (B) CD6-depletierten PBSC-Präparats der Spender sowie von (C) PBMC aus Normalspenderblut. Es wurde auf lebende Lymphozyten und anschließend auf CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> - NK-Zellen eingestellt (R1). Die CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> - NK-Zellen sind in der rechten Spalte in der CD56/CD6-Färbung gezeigt. Blauer Rahmen: CD56<sup>bright</sup>/CD6<sup>-</sup>-NK-Zellen; roter Rahmen: CD56<sup>dim</sup>/CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen. Der rote Pfeil veranschaulicht die Abreicherung CD6-positiver CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen durch die CD6-Depletion. Gleichzeitig kommt es zu einer Anreicherung CD6-negativer CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen (blauer Pfeil).

Man erkennt in Abbildung E2.3 sehr deutlich, dass die CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> - NK-Zellen sich aufgrund der CD6-Expression und der Stärke der CD56-Expression in zwei Gruppen unterscheiden lassen. Bei NK-Zellen aus PBMC gesunder Spender (Abbildung E2.3, C) zeigt sich, dass fast alle CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen (roter Rahmen) CD6 auf der Oberfläche exprimieren. Die CD56<sup>bright</sup>-

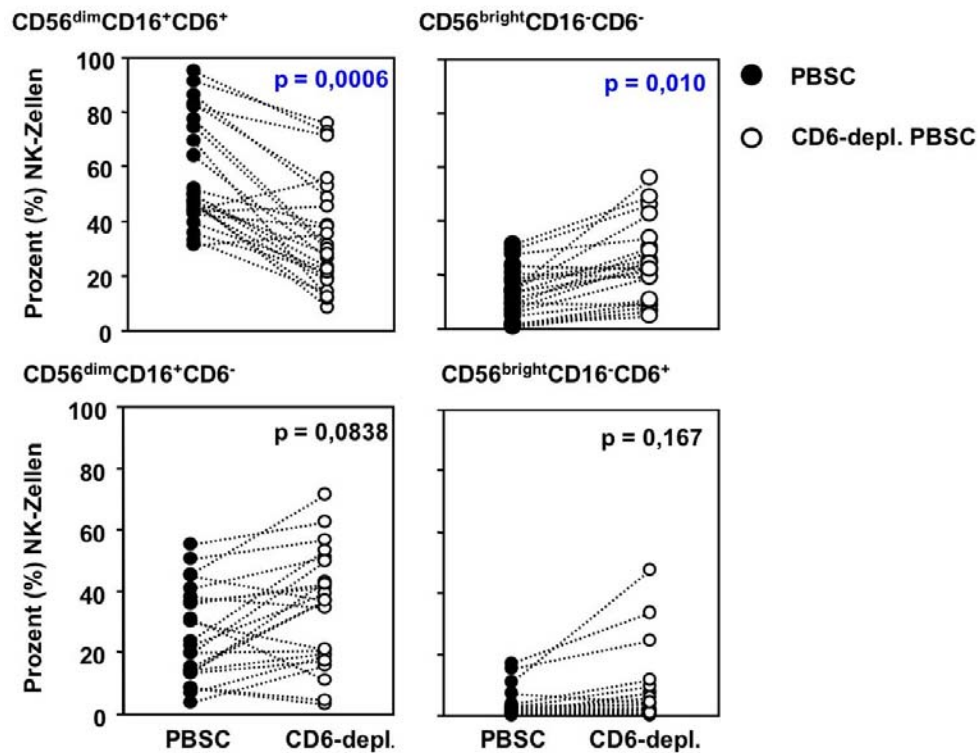
## E. ERGEBNISSE

NK-Zellen (blauer Rahmen Abbildung E2.3, C) sind hingegen CD6-negativ. Ein identisches Bild ergibt sich bei den PBSC der Spender für die HSZT nach G-CSF-Mobilisierung (Abb. E2.3, A). Durch die CD6-Depletion kommt es zu einer Abreicherung der CD6-positiven  $CD56^{\text{dim}}$ -NK-Zellen (roter Pfeil Abb. E2.3) und zu einer Anreicherung der  $CD56^{\text{bright}}$ -NK-Zellen (blauer Pfeil in Abbildung E2.3, B). Da  $CD56^{\text{bright}}$ -NK-Zellen im Gegensatz zu  $CD56^{\text{dim}}$ -NK-Zellen vorwiegend CD16-negativ sind, ist die Verteilung von CD6 auf CD16-positiven bzw. CD16-negativen NK-Zellen von Interesse. Deshalb wurden 26 Spenderpräparate auf die Expression von CD56, CD16 und CD6 mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, dass  $CD56^{\text{bright}}$ -NK-Zellen größtenteils CD16-negativ sind. Es wurden vier Subpopulationen unterschieden.  $CD56^{\text{dim}}$ -NK-Zellen mit CD16- und CD6-Expression ( $CD56^{\text{dim}}CD16^+CD6^+$ -NK-Zellen),  $CD56^{\text{dim}}$ -NK-Zellen mit CD16-Expression und fehlender oder sehr geringer CD6-Expression ( $CD56^{\text{dim}}CD16^+CD6^-$ ) und  $CD56^{\text{bright}}CD16^-CD6^+$ -NK-Zellen sowie  $CD56^{\text{bright}}CD16^-CD6^-$ -NK-Zellen. Zur Auswertung wurde auf lebende CD56-positive, CD3 $\epsilon$ -negative Zellen eingestellt und anschließend aufgrund der Expressionsdichte von CD56 in  $CD56^{\text{dim}}$ -Zellen und  $CD56^{\text{bright}}$ -Zellen aufgetrennt. Weiter wurden die beiden anhand der CD56-Expression aufgetrennten Populationen mittels Bool'scher Algebra in CD16-positive und CD16-negative sowie in CD6-positive und CD6-negative Zellen unterteilt und jeweils der Prozentsatz dieser Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der lebenden  $CD56^+CD3\epsilon^-$ -NK-Zellen berechnet. Tabelle T2.1 zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer Berechnung des Spenders 20D.

	% NK-Zellen	
	PBSC	CD6-depl. PBSC
<b><math>CD56^{\text{dim}}CD16^+CD6^+</math></b>	47,3	8,19
<b><math>CD56^{\text{dim}}CD16^+CD6^-</math></b>	37,84	34,32
<b><math>CD56^{\text{bright}}CD16^-CD6^-</math></b>	14,19	55,65
<b><math>CD56^{\text{bright}}CD16^-CD6^+</math></b>	0,67	1,84
	100	100

**Tabelle T2.1:** Exemplarisches Beispiel (Spender 20D) der Verteilung der einzelnen NK-Subpopulationen vor (PBSC) und nach CD6-Depletion (CD6-depl. PBSC).

## E. ERGEBNISSE



**Abbildung E2.4:** Abnahme der CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen durch CD6-Depletion. Gezeigt sind Prozent (%) NK-Zellen der einzelnen Subpopulation in Bezug auf die Gesamtzahl CD56<sup>+</sup>/CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>-Zellen. Es wurde auf CD56<sup>dim</sup> bzw. CD56<sup>bright</sup>-Zellen eingestellt und diese jeweils nach CD16/CD6 aufgetrennt und der Prozentanteil (Prozent (%)) NK-Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl aller NK-Zellen im jeweiligen Präparat (PBSC bzw. CD6-depletiertes PBSC) berechnet. Gezeigt sind die Daten von 26 Spendern, da die Gesamtzahl der NK-Zellen nicht bei allen Spendern für eine sichere Auswertung ausreichend war. Die in Abbildung E2.4 angegebenen Signifikanzwerte wurden gemäß Wilcoxon bestimmt, Stichprobengröße n = 26.

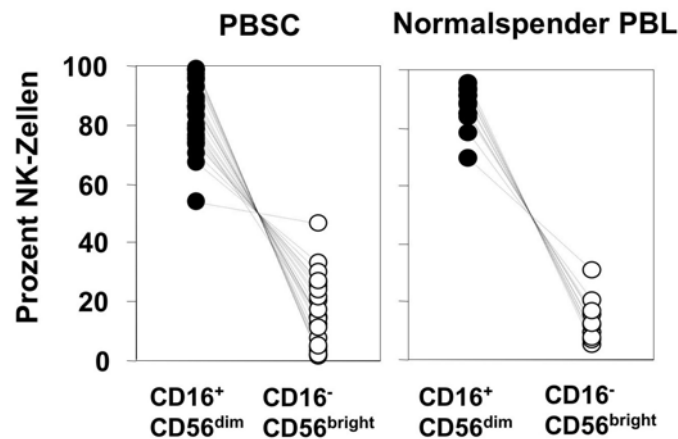
CD6 findet sich auf allen CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>-NK-Zellen in unterschiedlicher Dichte, wohingegen CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>-NK-Zellen keine oder nur sehr geringe CD6-Expression zeigen und damit auch keiner signifikanten CD6-Depletion unterliegen (Abbildung E2.4). Die CD6-Depletion führt zu einer statistisch signifikanten Abnahme ( $p = 0,0006$ ,  $n = 26$ ) von CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen und bedingt durch die scharfe Abtrennung durch den anti-CD6-Antikörper zu einer jedoch nicht statistisch signifikanten Anreicherung einiger CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD6<sup>-</sup>-NK-Zellen im Transplantat (in Bezug auf die Gesamtzahl der Zellen) ( $p = 0,0838$ ,  $n = 26$ ). Dies bedeutet, dass nicht alle CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen depletiert werden, da die Depletion über den anti-CD6-Antikörper durch die Bindungsstärke des Antikörpers abhängig von der Dichte der CD6-Expression auf den Zellen ist. Im Gegensatz dazu unterliegen CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>-NK-Zellen aufgrund ihrer fehlenden CD6-Expression nicht einer statistisch signifikanten Depletion ( $p = 0,167$ ,  $n = 26$ ) und verbleiben somit im Transplantat. Auch CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD6<sup>-</sup>-NK-Zellen wurden durch die CD6-Depletion statistisch signifikant angereichert ( $p = 0,010$ ,  $n = 26$ ). Somit kommt es also zu einer Verschiebung des



## E. ERGEBNISSE

Verhältnisses zwischen den  $CD56^{dim}CD16^{+}$ - und  $CD56^{bright}CD16^{-}$ -Populationen zu Gunsten der  $CD56^{bright}CD16^{-}CD6^{-}$ -NK-Zellen

Um einen möglichen Einfluss der G-CSF-Mobilisierung auf die Verteilung der  $CD56^{dim}CD16^{+}$  bzw.  $CD56^{bright}CD16^{-}$ -NK-Zellpopulationen auszuschließen, wurden Normalspender und die Stammzellpräparate der Spender bezüglich der Verteilung dieser beiden Populationen verglichen (Abbildung E2.5).



**Abbildung E2.5:** Vergleich der Verteilung der NK-Subpopulationen  $CD56^{dim}CD16^{+}$  und  $CD56^{bright}CD16^{-}$  bei Normalspendern (n = 12) und PBSC von 23 Spendern.

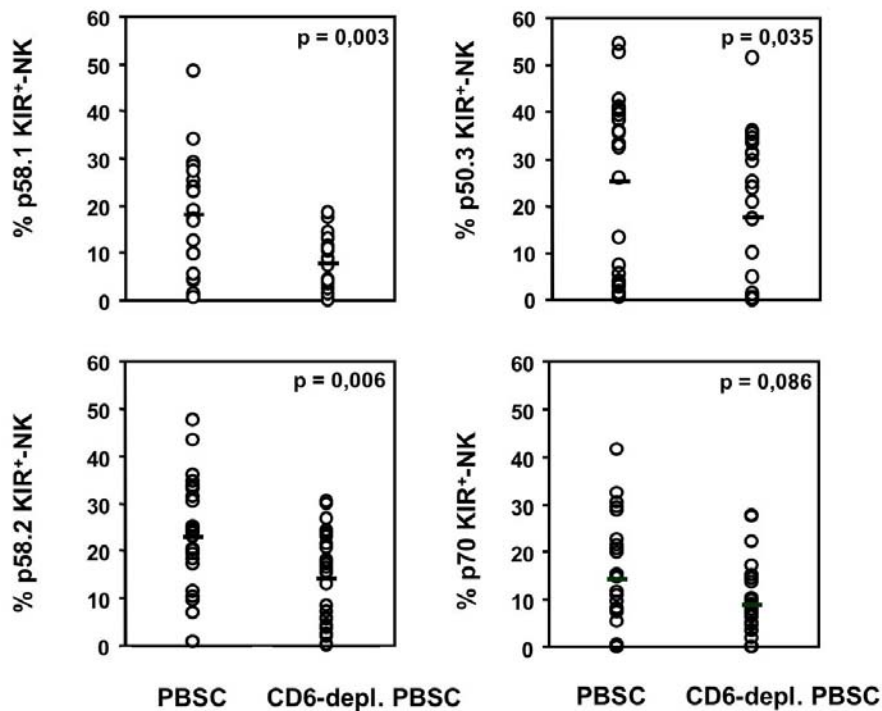
Dabei zeigte sich, dass die Verteilung der  $CD56^{dim}CD16^{+}$ -NK-Zellen und  $CD56^{bright}CD16^{-}$ -NK-Zellen bei Normalspendern und den PBSC-Präparaten nahezu identisch ist. Ein Einfluss der G-CSF-Mobilisierung auf die NK-Populationen kann daher ausgeschlossen werden.

### 2.3 Modulation des NK-Zellrepertoires aufgrund der CD6-Depletion

Um den Einfluss der CD6-Depletion auf das NK-Repertoire genauer zu bestimmen, wurden die gemäß Methoden 2.2.3 aufgearbeiteten PBSC- und CD6-depletierte PBSC-Präparate von 30 Spendern auf ihre Expression von KIR-Rezeptoren mittels FACS-Analyse untersucht. Es wurde die Expression von CD158a (p58.1; KIR2DL1/2DS1), CD158b (p58.2/3, KIR2DL2/3/2DS2), CD158i (p50.3, KIR2DS4) und CD158e1 (p70, KIR3DL1/3DS1) auf  $CD56^{+}/CD3\epsilon^{-}$ -NK-Zellen untersucht. Da die Antikörper gegen KIR-Rezeptoren nicht zwischen den langen, inhibitorischen (KIR-L) und den kurzen, aktivierenden (KIR-S) Rezeptoren unterscheiden können, kann aus der Verteilung der KIR-Populationen kein Rückschluss über die Funktion gezogen werden. Daher sind für die  $KIR^{+}$ -Populationen beide Möglichkeiten (KIR-L/S) angegeben.



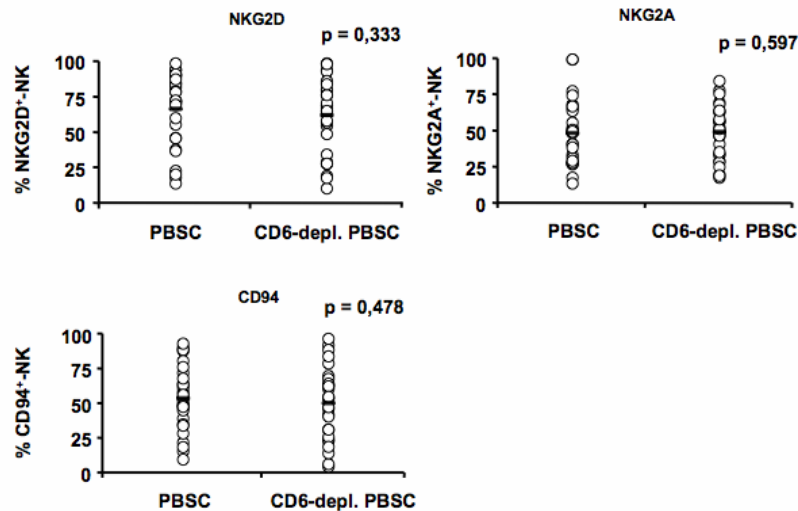
## E. ERGEBNISSE



**Abbildung E2.6:** Prozent KIR-positiver NK-Zellen in Bezug auf Gesamtzahl CD56<sup>+</sup> CD3ε<sup>-</sup> NK-Zellen in den PBSC- und CD6-depletierten PBSC-Präparaten von 30 Spendern. Es wurde auf lebende Lymphozyten eingestellt und anschließend auf CD56<sup>+</sup> CD3ε<sup>-</sup> NK-Zellen. Die p-Werte wurden gemäß Wilcoxon bestimmt. Der Mittelwert ist durch das Symbol – gekennzeichnet.

Im Zuge der Depletion CD6-positiver NK-Zellen kommt es zu einer statistisch signifikanten Abnahme KIR2DL1/2DS1-positiver NK-Zellen ( $p = 0,003$ ,  $n = 21$ ) (p58.1, Abbildung E2.6, oben links) bei 21 Spendern und bei 9 Spendern zu einer statistisch nicht-signifikanten Zunahme ( $p = 0,222$ , nicht gezeigt). Auch im Fall KIR2DL2/2DS2-positiver (p58.2) bzw. KIR2DS- (p50.3)-positiver NK-Zellen lässt sich eine statistisch signifikante Abnahme nach CD6-Depletion feststellen ( $p = 0,006$  bei p58.2 und  $p = 0,035$  bei p50.3). Im Fall p58.2-positiver NK-Zellen wurde bei 2 Spendern keine Veränderung festgestellt, im Fall von p50.3 bei 8 Spendern ( $p = 0,196$ , nicht gezeigt). Bei KIR3DL1/3DS1-positiven NK-Zellen (p70) zeigt sich, mit Ausnahme von 4 Spendern ( $p = 0,150$ , nicht gezeigt), auch eine Abnahme durch CD6-Depletion, es liegt jedoch keine statistische Signifikanz vor ( $p = 0,086$ , Abbildung E2.6), wenn alle Spender in die Berechnung einbezogen werden.

Die CD6-Depletion führt also zu einer statistisch signifikant verringerten Anzahl KIR-positiver NK-Zellen in allen untersuchten Spender-Präparaten. Da alle NK-Zellen die typischen Marker NKG2D, CD94/NKG2A-Heterodimer (siehe Abbildung E2.6), 2B4 (CD244), CD161 und die NCRs NKp30 und NKp46 exprimieren, konnte in Bezug auf diese Marker keine Veränderung im Vergleich zwischen PBSC und CD6-depletiertem PBSC festgestellt werden (Abbildung E2.7, Seite 106). Der Aktivierungsmarker NKp44 konnte nicht auf den NK-Zellen der PBSC- und CD6-depletierten PBSC-Präparate nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass NK-Zellen nicht durch G-CSF oder die Depletionsprozedur aktiviert werden.



**Abbildung E2.7:** Prozent NKG2D, NKG2A und CD94-positiver NK-Zellen im PBSC und CD6-depletiertem PBSC von 28 Spendern in Bezug auf die Gesamtzahl CD56<sup>+</sup> CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>-NK-Zellen. Die p-Werte wurden gemäß Wilcoxon bestimmt. Der Mittelwert ist durch das Symbol — gekennzeichnet.

## 2.4 Veränderung der Funktion des im Transplantat verbleibenden NK-Repertoires im Vergleich zu NK-Zellen aus PBSC vor Depletion

### 2.4.1 Isolierung von NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletierten PBSC

Für eine genauere Untersuchung der Funktion der NK-Zellen im CD6-depletierten PBSC im Vergleich zum PBSC sollten die NK-Zellen zunächst mittels negativer NK-Isolation nach Dynal<sup>®</sup> aus den Präparaten isoliert werden. Dafür mussten die eingefrorenen Präparate aufgetaut werden. Es zeigte sich, dass es zu einer starken Verklumpung der Zellen beim Auftauen kam (Allgemeines Auftauverfahren), so dass eine neue Auftauprozedur erarbeitet werden musste. Beim neu entwickelten Auftauverfahren gemäß Methoden 2.5.2 wurde DNase eingesetzt, da beim Einfrieren der Zellen gemäß Methoden 2.4.2 eine nicht unerhebliche Anzahl der Zellen durch Apoptose große Mengen an DNS freisetzen, die zu einer starken Verklumpung führt. Die Zellen der Spenderpräparate sind durch die lange *ex vivo* Manipulation von mehr als 24 Stunden einer mechanischen Belastung und zellulärem Stress ausgesetzt. Der negativen NK-Isolation wurde falls notwendig eine CD3-vermittelte T-Zell-Depletion (DynaBeads<sup>®</sup>CD3) vorgeschaltet, um die Effizienz der NK-Isolierung zu erhöhen. Durch den Auftauschritt, die anschließende Isolierung von Lymphozyten mittels Ficoll-Gradient und die hohe Autolyserate der Zellen in den Präparaten war die Ausbeute an Zellen nach NK-Isolierung sehr gering.

## E. ERGEBNISSE

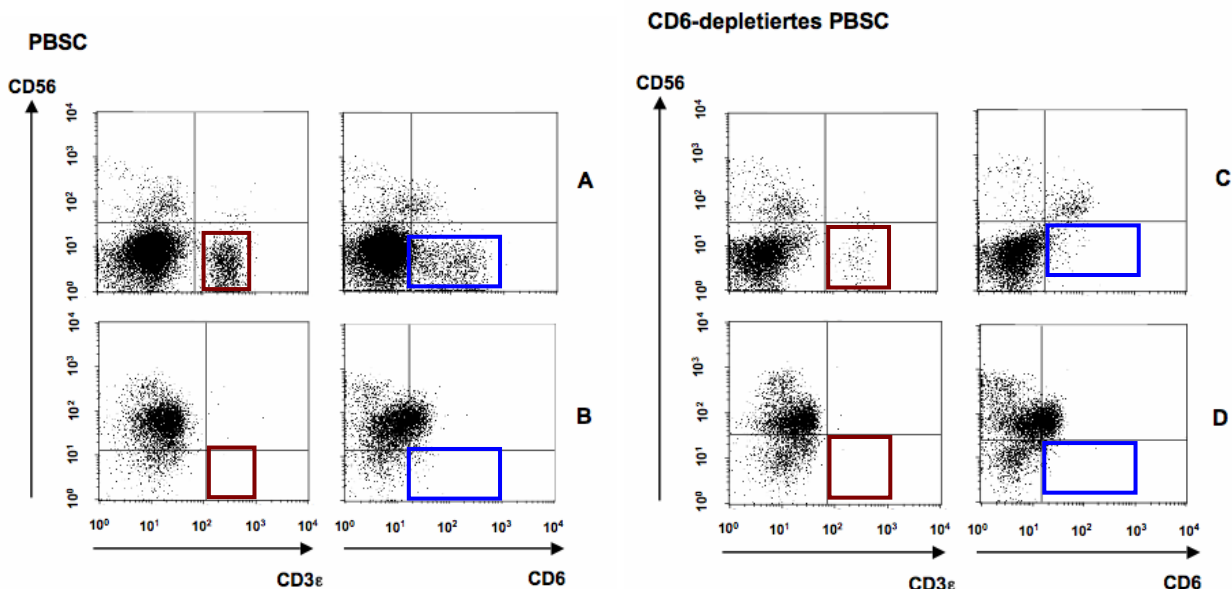
Spender	Präparat	Zellzahl vor NK-Isolation	Zellzahl nach NK-Isolation	Ausbeute (%)
2D	PBSC	$120 \times 10^6$	$1,92 \times 10^6$	1,6
	CD6-depl.	$175 \times 10^6$	$0,36 \times 10^6$	0,2
7D	PBSC	$37,5 \times 10^6$	$0,72 \times 10^6$	1,92
	CD6-depl.	$43,5 \times 10^6$	$0,56 \times 10^6$	1,28

**Tabelle T2.2:** Ausbeute in Prozent an NK-Zellen nach Aufarbeitung der PBSC- und CD6-depletierten PBSC (CD6-depl.) und NK-Negativisolation. Exemplarisch sind zwei Versuche mit Präparaten von zwei verschiedenen Spendern gezeigt.

Aus Tabelle T2.2 geht hervor, dass die Aufarbeitung der zuvor eingefrorenen Präparate und anschließende NK-Isolation aufgrund der hohen Zellverluste während der einzelnen Aufarbeitungsschritte zu einer sehr geringen Ausbeute an NK-Zellen führt.

Es wurden insgesamt 6 Versuche im Sinne einer NK-Isolation aus unterschiedlichen Präparaten durchgeführt. Dabei konnten aufgrund der geringen Ausbeute nur FACS-Analysen und in einem Fall versuchsweise ein Chromfreisetzungstest durchgeführt werden, wobei jedoch keine zytotoxische Aktivität der isolierten NK-Zellen beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Bei den FACS-Analysen konnte eine gute Abtrennung der NK-Zellen von anderen Zellen aus den Präparaten beobachtet werden.



**Abbildung E2.8:** Exemplarische FACS-Analyse des PBSC- bzw. CD6-depletierten PBSC-Präparats eines Spenders vor (A : PBSC, C: CD6-depl. PBSC) und nach (B: PBSC, D: CD6-depl. PBSC ) negativer NK-Isolation. Es wurde auf lebende Lymphozyten eingestellt. Es sind die Färbungen CD56-APC gegen CD3ε-PerCP und CD56-APC gegen CD6-PE gezeigt.

## E. ERGEBNISSE

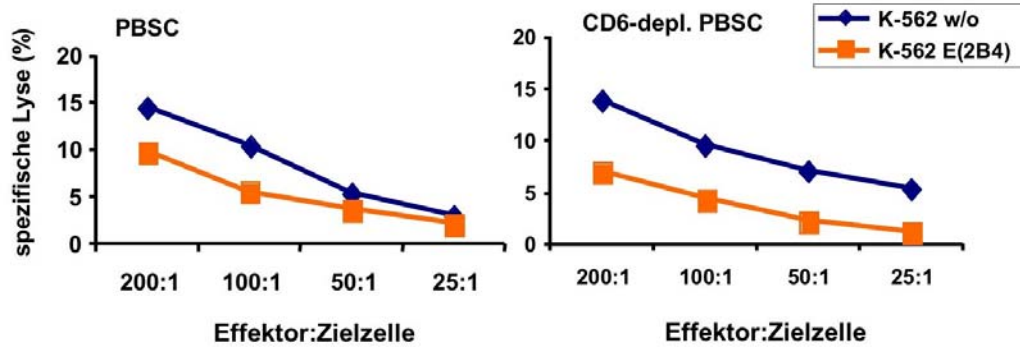
In Abbildung E2.8 erkennt man im Fall der PBSC und der CD6-depletierten PBSC eine Abreicherung der  $CD3\epsilon^+$ -T-Zellen und damit der  $CD6^+ CD3\epsilon^+$ -T-Zellen (blauer Rahmen). Gleichzeitig erfolgt eine starke Anreicherung  $CD56^+$ -NK-Zellen (linker oberer Quadrant in den Abbildungen B und D). Die NK-Negativisolierung führte somit zu einer selektiven Anreicherung von NK-Zellen aus den Präparaten, jedoch mit nicht ausreichender Ausbeute, um mit den isolierten NK-Zellen weitere funktionelle Versuche durchführen zu können.

Zusammenfassend konnte ich erstmals zeigen, dass die CD6-Depletion von Stammzellpräparaten der Spender zu einer Anreicherung von  $CD34^+$ -Stammzellen führt und bei gleichzeitiger Depletion des Großteils an T-Zellen zu einer Depletion einer CD6-positiven Subpopulation von NK-Zellen führt. Diese  $CD6^+CD56^+CD3\epsilon^-$ -NK-Zellen sind überwiegend KIR-positiv (p58.1, p58.2, p70, p50.3). Daher lässt sich eine statistisch signifikante Abnahme KIR-positiver NK-Zellen im CD6-depletierten PBSC nachweisen. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass CD6 einen differentiellen NK-Marker darstellt, der sich auf allen  $CD56^{dim}CD16^+$ -NK-Zellen nachweisen lässt, nicht jedoch auf  $CD56^{bright}CD16^-$ -NK-Zellen.

### 2.4.2 Zytotoxizität und Degranulation von NK-Zellen in PBSC und CD6-depletierten PBSC

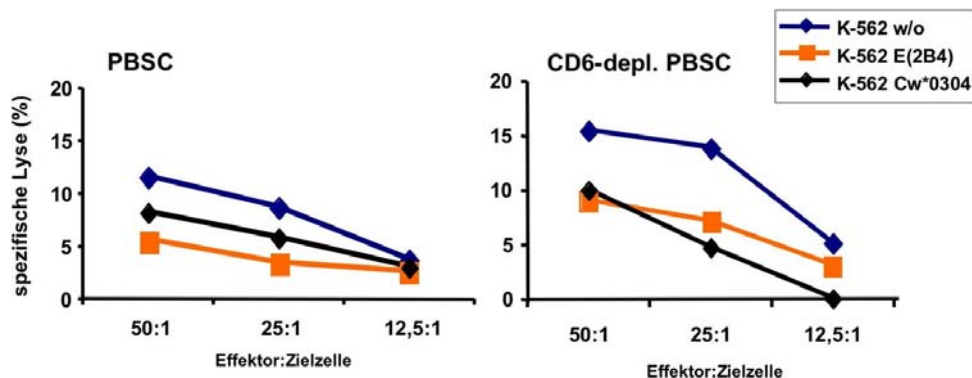
Um die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen in den PBSC und CD6-depletierten PBSC zu untersuchen, und damit einen möglichen Unterschied in der Funktion der  $CD6^+$ - bzw. der CD6-negativen-NK-Population aufzuzeigen, sollten ursprünglich isolierte NK-Zellen aus den Präparaten auf ihre Zytotoxizität gegen verschiedene Zielzellen getestet werden. Da eine Isolierung von NK-Zellen in ausreichender Zahl aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht möglich war, wurden Zellen aus den PBSC- und CD6-depletierten PBSC-Präparaten ohne vorherige Auftrennung in einem Chromfreisetzungsversuch nach 24 Stunden Kultivierung in RPMI III + 10% HS bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> eingesetzt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass nur NK-Zellen zu einer alloreaktiven, zytotoxischen Reaktion nach 4 Stunden Koinkubation mit den radioaktiv markierten HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen in der Lage sind. T-Zellen können in der Regel HLA-Klasse-I-negative Zielzellen nicht erkennen bzw. lysieren und benötigen für eine Aktivierung gegen Zielzellen einen längeren Zeitraum und die Wechselwirkung mit Antigenpräsentierenden Zellen. Darüber hinaus sind sie ohne HLA-Expression auf Zielzellen de facto blind für die Zielzellen. Daher kann die beobachtete Lyse der HLA-Klasse-I-negativen K-562-Linie der NK- und nicht der T-Zellaktivität zugeschrieben werden.

## E. ERGEBNISSE



**Abbildung E2.9:** Spezifische Lyse in Prozent der  $^{51}\text{Cr}$ -markierten K-562-Wildtyp- (K-562 w/o) und HLA-Transfektante (K-562-E(2B4)) durch NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletiertem PBSC eines Spenders.

Aus Abbildung E2.9 geht hervor, dass es durch die NK-Zellen des PBSC- und CD6-depletierten PBSC des Spenders zu einer geringen zytotoxischen Aktivität gegenüber der K-562-Zelllinie kommt, die durch die Expression von HLA-E im Fall der K-562-E(2B4)-Transfektante teilweise abgeschaltet werden kann. Die Abschaltung erfolgt über das CD94/NKG2A-Heterodimer. Die nach CD6-Depletion im Transplantat verbleibenden NK-Zellen zeigen also gegenüber Zielzellen eine zytotoxische Aktivität, die sich über die Wechselwirkung des CD94/NKG2A-Heterodimers mit HLA-E auf Zielzellen abschalten lässt. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen der Aktivität der NK-Zellen vor bzw. nach Depletion beobachtet werden.

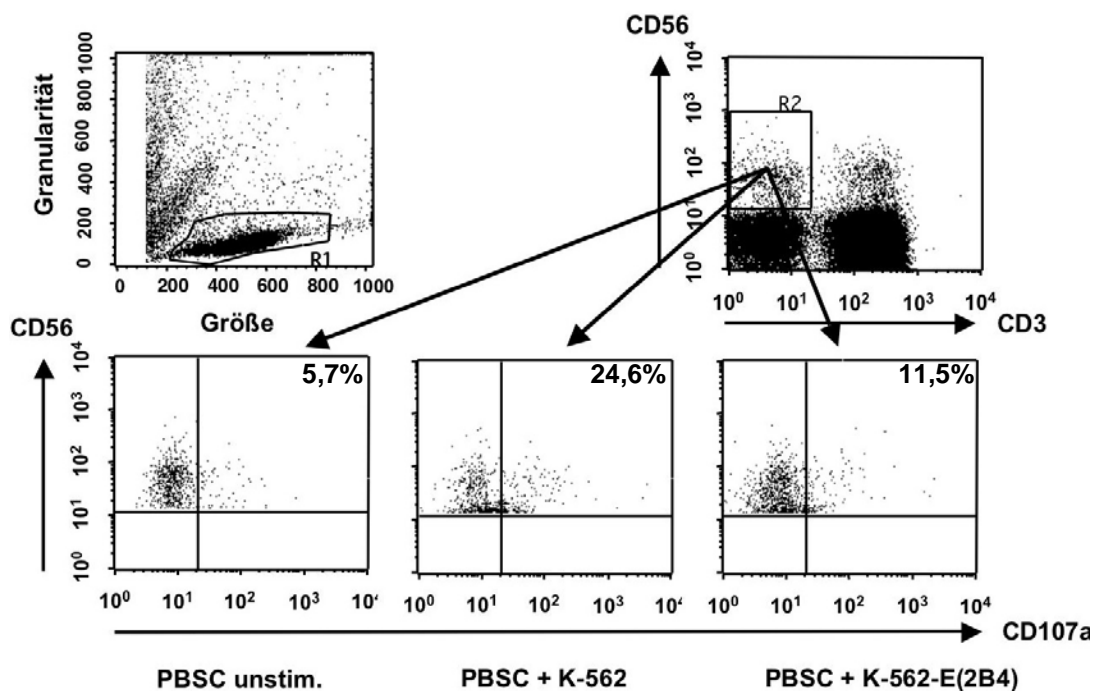


**Abbildung E2.10:** Spezifische Lyse in Prozent der  $^{51}\text{Cr}$ -markierten K-562-Wildtyp- (K-562 w/o) und HLA-Transfektanten (K-562-E(2B4), K-562-Cw\*0304) durch NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletiertem PBSC eines Spenders.

Bei einer Wiederholung des Versuchs mit Zellen des gleichen Spenders nach weiteren 24 Stunden Inkubation in RPMI III + 10% HS, konnte ein ähnliches Bild beobachtet werden (Abb. E2.10). Dabei wurde neben der K-562-E-Transfektante auch eine HLA-Cw\*0304 Transfektante von K-562 als Zielzelle eingesetzt (K-562-Cw\*0304). Da bei den Zellen des PBSC bzw. CD6-depletierten PBSC eines anderen Spenders keine Zytotoxizität

## E. ERGEBNISSE

nachgewiesen werden konnte, und ein Einfluss der in den Präparaten vorhandenen T-Zellen auf die Zytolyse der Zielzellen nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte, wurde die Zytotoxizität bei weiteren Spenderproben durch die Untersuchung der Degranulation, d.h. der Expression von CD107a auf NK-Zellen nach Stimulation mit Zielzellen bestimmt. Alter und Altfeld et al. haben publiziert, dass CD107a als Membran-Fusionsmarker zwischen Endosomen und Zellmembran einen Marker für die NK-Zell-Aktivität darstellt (Alter, Malenfant et al. 2004). Penack und Gentilini et al. haben nachgewiesen, dass die Expression von CD107a auf NK-Zellen nach Stimulation mit Zielzellen mit der im Chromfreisetzungsversuch beobachteten Zytotoxizität von NK-Zellen korreliert (Penack, Gentilini et al. 2005). Für die Bestimmung der CD107a Expression nach Stimulation mit Zielzellen für 3 Stunden wurden Proben von 6 Spendern untersucht. Die PBSC- und CD6-depletierten PBSC wurden direkt nach der Aufarbeitung für 24 Stunden in RPM III + 10% HS in Kultur genommen und anschließend die Lymphozyten mittels Ficoll-Dichtegradient isoliert. Als Zielzellen dienten K-562-Zellen und eine HLA-E-Transfektante von K-562 (K-562-E(2B4)). Der Nachweis CD107a-positiver NK-Zellen erfolgte mittels FACS-Analyse, wobei auf lebenden Zellen und anschließend auf  $CD56^+CD3\epsilon^-$ -Zellen eingestellt wurde. Durch die Färbung von CD56 gegen CD107a konnte der Prozentsatz CD107a-positiver NK-Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl berechnet werden (Abb. E2.11).



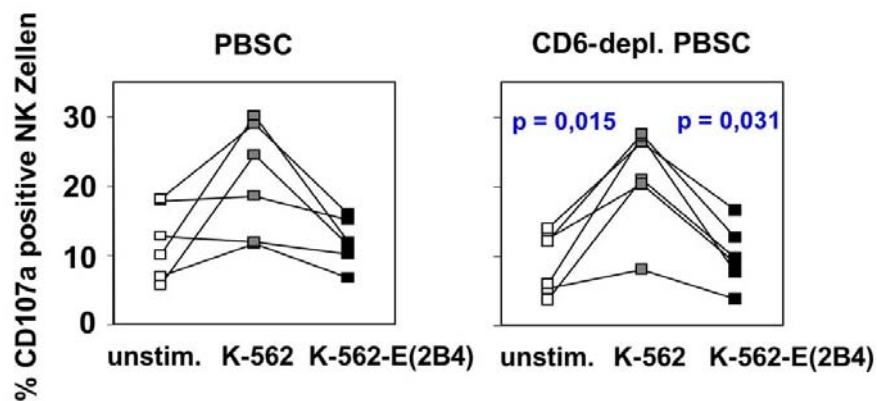
**Abbildung E2.11:** Exemplarisches Beispiel der Gatingstrategie des CD107a-Degranulations-Versuchs. Nach Charakterisierung lebender Zellen (R1) wurde auf  $CD56^+CD3\epsilon^-$ -NK-Zellen eingestellt (R2). Anschließend wurden lebende NK-Zellen (R1 und R2) in einem Dot-Plot mit CD56 gegen CD107a dargestellt und der Prozentsatz CD107a-positiver NK-Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der NK-Zellen bestimmt.

## E. ERGEBNISSE

Effektor Zielzelle	PBSC			CD6-depl. PBSC		
	unstim.	K-562	K562-E(2B4)	unstim.	K-562	K-562-E(2B4)
<b>Spender</b>						
<b>17D</b>	5,71	24,61	11,52	3,62	20,89	9,57
<b>18D</b>	6,99	11,73	6,61	5,23	8,02	3,69
<b>19D</b>	17,89	18,6	15,17	13,92	26,26	16,45
<b>21D</b>	18,18	28,99	15,94	5,92	27,19	7,52
<b>22D</b>	12,78	11,9	10,2	12,42	20,22	8,77
<b>23D</b>	10,05	30,17	11,96	12,06	27,44	12,54
<b>MW</b>	<b>11,9</b>	<b>21,0</b>	<b>11,9</b>	<b>8,9</b>	<b>21,7</b>	<b>9,8</b>

**Tabelle T2.3:** Prozent CD107a-positiver NK-Zellen in Bezug auf NK-Gesamtzahl. Auswertung von 6 Versuchen mit PBSC bzw. CD6-depletierten PBSC 6 verschiedener Spender (17D, 18D, 19D, 21D, 22D, 23D). Die angegebenen Signifikanzwerte wurden gemäß Wilcoxon berechnet. Als Zielzellen diente Wildtyp K-562 (K-562) und die HLA-E-Transfektante K-562-E(2B4).



**Abbildung E2.12:** Prozent CD107a-positiver NK-Zellen nach Stimulation mit Zielzellen und unstimuliert der PBSC und CD6-depletierten PBSC 6 verschiedener Spender (Vergleiche Tabelle T2.3).

Wie aus Tabelle T2.3 und Abbildung E2.12 hervorgeht, kommt es bei NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletierten PBSC aller 6 untersuchten Spender zu einer Zunahme CD107a-positiver NK-Zellen nach Stimulation mit K-562-Zellen im Vergleich zur unstimulierten Situation. Die Zunahme ist im Fall der CD6-depletierten PBSC statistisch signifikant ( $p = 0,015$ ), im Fall der PBSC vor CD6-Depletion jedoch knapp nicht signifikant ( $p = 0,065$ ). Darüber hinaus lässt sich bei allen Spenderpräparaten eine Verringerung der CD107a-Degranulation nach Stimulation mit der HLA-E-Transfektante K-562-E(2B4) im Vergleich zur Stimulation mit Wildtyp K-562 beobachten. Diese Abschaltung ist im Fall der CD6-

## E. ERGEBNISSE

---

depletierten PBSC statistisch signifikant ( $p = 0,031$ ) und korreliert mit der CD94/NKG2A-Expression auf den NK-Zellen (Daten der CD94/NKG2A-Expression nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass NK-Zellen im PBSC nach Stammzellmobilisierung durch G-CSF und nach CD6-Depletion zytotoxisch gegenüber HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen sind und diese Zytotoxizität durch HLA-E abschaltbar ist. Im Fall der CD6-negativen NK-Zellen in den CD6-depletierten PBSC konnte eine statistisch signifikante Degranulation nach Stimulation mit K-562-Zellen und eine statistisch signifikante Abschaltung durch HLA-E gezeigt werden. Die mittels CD107a nachgewiesene Degranulation weist auf ein unverändertes zytotoxisches Aktivierungspotential der NK-Zellen vor und nach Depletion hin. Daneben konnte in einem Fall auch im Chromfreisetzungstest die Zytotoxizität der NK-Zellen im PBSC bzw. CD6-depletierten PBSC nachgewiesen werden. Die transplantierten NK-Zellen zeigen also *in vitro* die Fähigkeit zur Lyse HLA-Klasse-I-negativer Zellen, die durch die Depletion der CD6<sup>+</sup>-Subpopulation nicht verändert wird.

### 2.4.3 Proliferation von NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletierten PBSC nach Stimulation

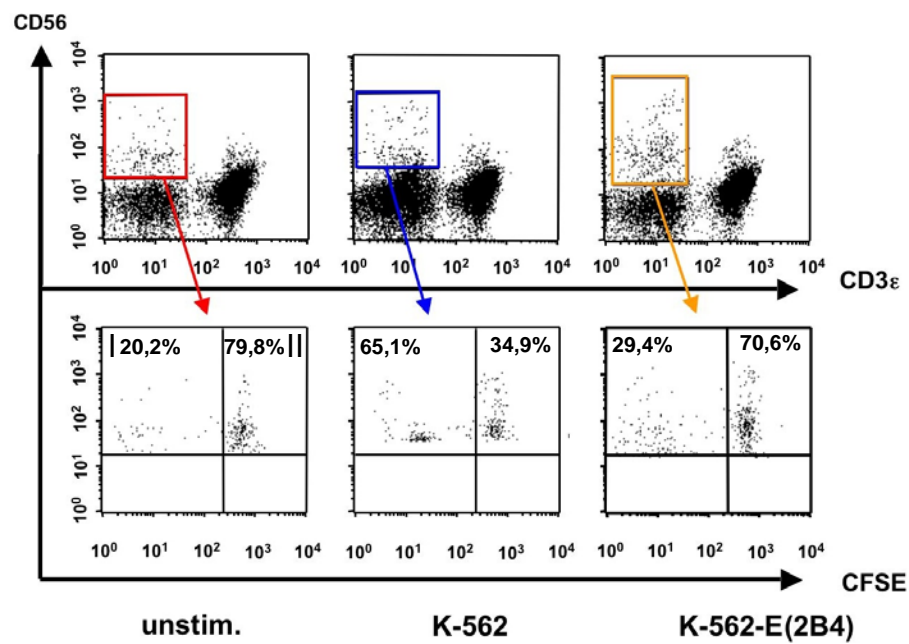
Um die Frage zu klären, ob die in den PBSC und CD6-depletierten Präparaten enthaltenen NK-Zellen nach Stimulation proliferieren, wurden Präparate von 10 Spendern mittels FACS-Analyse untersucht. Die Versuche wurden gemäß Methoden 7 und 5.2 durchgeführt. Die PBSC- und CD6-depletierten PBSC wurden direkt nach der Aufarbeitung für 24 Stunden in RPM III + 10% HS in Kultur genommen und anschließend die Lymphozyten mittels Ficoll-Dichtegradient isoliert. Die Stimulation erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen durch bestrahlte K-562 Wildtypzellen und die HLA-E-Transfektante von K-562 (K-562-E(2B4)). Weiterhin wurden Ansätze ohne Stimulation (unstim.) angesetzt.

Nach Beendigung der Kokultivierung wurden die Zellen geerntet und mit CD56 und CD3ε für die T- bzw. CD19 für die B-Zellen gefärbt und am FACS-Calibur quantifiziert (Abbildungen E2.13 und E2.14, Seite 113).



## E. ERGEBNISSE

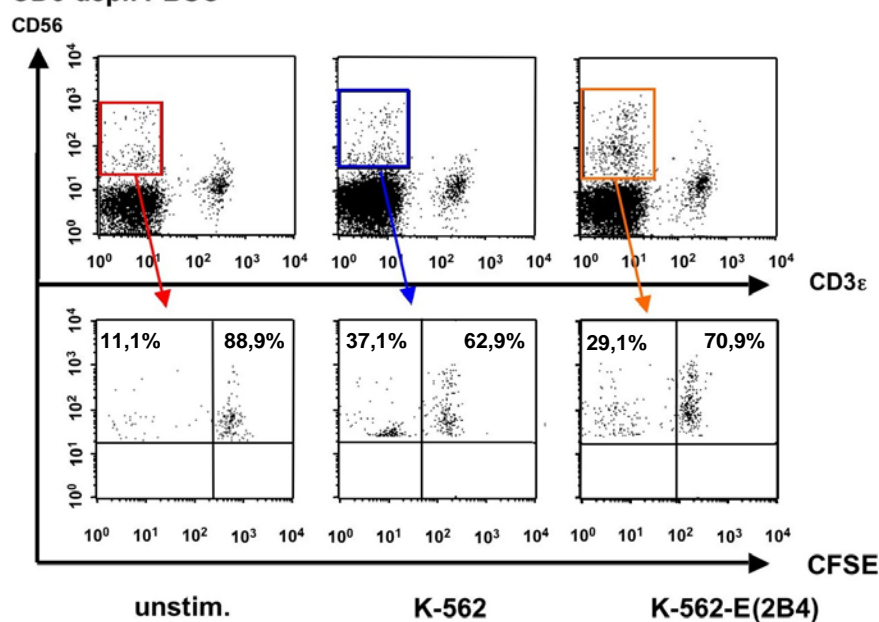
### PBSC



**Abbildung E2.13:** Exemplarisches Beispiel einer FACS-Analyse in Bezug auf die Proliferation von NK-Zellen aus PBSC nach Stimulation mit K-562 und K-562-E(2B4) im Vergleich zur Proliferation ohne Stimulus. Lebende Lymphozyten wurden aufgrund ihrer Größe und Granularität identifiziert. Anschließend wurde auf CD56<sup>+</sup>CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>-NK-Zellen

gated (farbige Rahmen). Der Anteil der NK-Zellen mit hoher CFSE-Färbung (II) und der Zellen mit abnehmender CFSE-Färbung (I, CFSE<sup>low</sup>), also proliferierender Zellen, wurde in Bezug auf die Gesamtzahl der Zellen in Prozent berechnet.

### CD6-depl. PBSC



**Abbildung E2.14:** entsprechend Abbildung E2.12, mit der Ausnahme, dass es sich um das CD6-depletierte PBSC handelt.

Die nicht-zelltoxische Färbung mit CFSE führt zu einer kovalenten Bindung des Farbstoffs an Zellproteine, wobei die Fluoreszenz des Farbstoffs mit jeder Zellteilung halbiert wird und somit bei Proliferation im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle abnimmt. Zellen mit geringerer CFSE-Färbung (CFSE<sup>low</sup>) stellen somit Zellen nach Teilung dar. Durch die Färbung mit CD56 für NK- und CD3 $\epsilon$  für T- bzw. CD19 für B-Zellen konnte so die

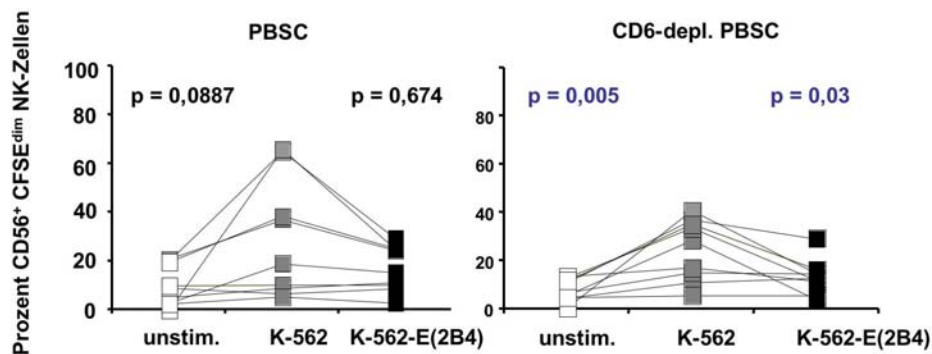
## E. ERGEBNISSE

Proliferation von NK-Zellen, T-Zellen oder B-Zellen nach Stimulus verfolgt und quantifiziert werden (Tabelle T2.4).

Effektor Stimulator	PBSC			CD6-depl. PBSC		
	unstim.	K-562	K-562-E(2B4)	unstim.	K-562	K-562-E(2B4)
<b>Spender</b>						
16D	5,06	9,00	11,21	4,76	10,99	12,92
17D	20,78	37,1	24,53	5,89	28,55	3,9
18D	9,91	10,27	10,27	11,94	35,22	16,59
19D	20,25	65,09	29,41	11,11	37,07	29,13
20D	2,94	18,87	15,32	13,19	33,64	11,96
21D	19,67	38,46	25,23	6,9	15,15	14,68
22D	0,00	66,0	25,0	0,65	40,95	14,71
23D	9,09	6,67	8,86	13,53	17,19	11,71
25D	9,91	10,27	10,27	11,94	35,22	16,59
26D	2,45	5,38	2,92	5,01	5,79	5,7
<b>MW</b>	<b>10,0</b>	<b>26,7</b>	<b>16,3</b>	<b>8,5</b>	<b>26,0</b>	<b>13,8</b>

**Tabelle T2.4:** Gezeigt ist der Prozentsatz der proliferierenden, d.h. CFSE<sup>low</sup> CD56<sup>+</sup>CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>-NK-Zellen von PBSC- und CD6-depletierten PBSC (CD6-depl. PBSC) 10 verschiedener Spender (D16-D26), sowie die Mittelwerte und die Signifikanzwerte (Wilcoxon-Test).



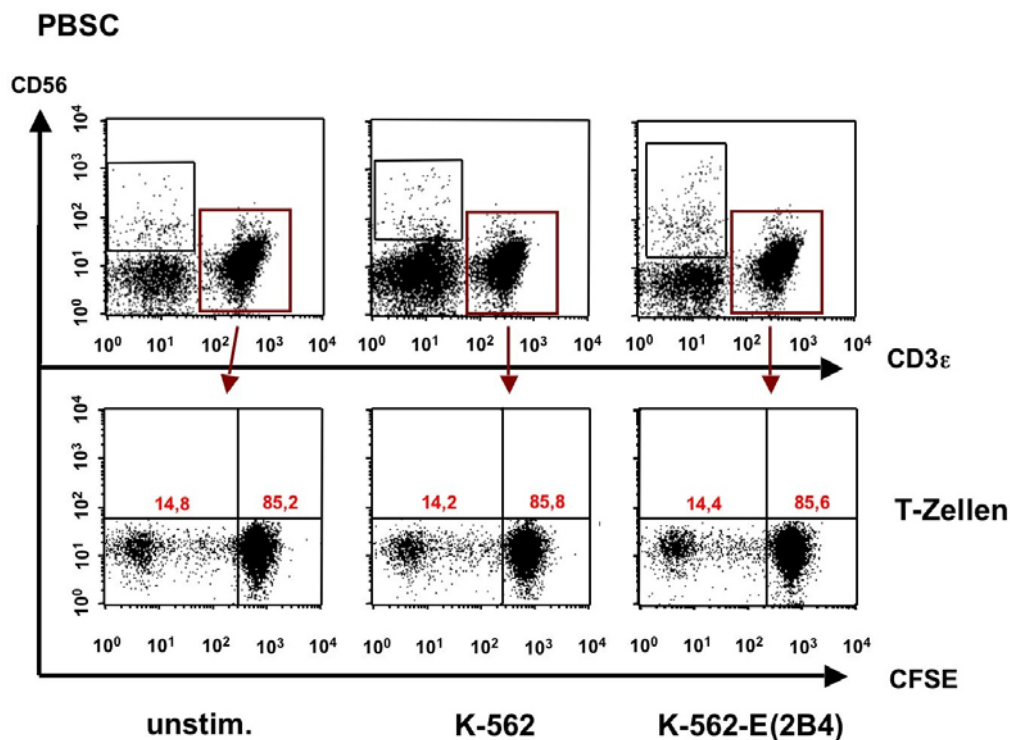
**Abbildung E2.15:** Graphische Darstellung der ermittelten Werte aus Tabelle T2.4. Gezeigt ist der Prozentsatz proliferierender CD56<sup>+</sup>CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>-NK-Zellen aus PBSC und CD6-depl. PBSC zehn verschiedener Spender.

Wie aus Tabelle T2.4 und Abbildung E2.15 hervorgeht, lässt sich nach Stimulation mit K-562 für fünf Tage eine Proliferation (d.h. Abnahme der CFSE-Färbung) der CD56<sup>+</sup>CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>-NK-Zellen bei allen Spenderpräparaten beobachten, die jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Im Fall der NK-Zellen der CD6-depletierten PBSC lässt sich eine statistisch signifikante

## E. ERGEBNISSE

Zunahme der Proliferation ( $p = 0,005$ ) nach Stimulus im Vergleich zur unstimulierten Situation belegen. Bei allen Spenderpräparaten lässt sich weiterhin eine Abnahme der NK-Zellproliferation durch Stimulation mit K-562-E(2B4) beobachten, die jedoch immer noch größer als die Proliferation ohne Stimulus ist. Wiederum lässt sich bei den NK-Zellen aus CD6-depletierten PBSC eine statistische Signifikanz ( $p = 0,03$ ) erkennen.

Im Gegensatz zu der deutlich messbaren NK-Proliferation konnte bei der Auswertung in Bezug auf CD56-negative CD3 $\epsilon^+$ -T-Zellen und CD19 $^+$ -B-Zellen keine Proliferation gezeigt werden. Abbildung E2.16 veranschaulicht dies an einem exemplarischen Beispiel.



**Abbildung E2.16:** Exemplarische Darstellung der T-Zellen (CD56 $^-$ CD3 $\epsilon^+$ ) aus PBSC eines stellvertretenden Spenders nach Stimulation für 5 Tage durch K-562 bzw. K-562-E(2B4) oder unstimuliert. Es wurde auf lebende Lymphozyten und anschließend auf CD3 $\epsilon^+$ -Zellen eingestellt. In der unteren Reihe der Abbildung ist die CD56 gegen CFSE-Färbung gezeigt. Der jeweilige Prozentsatz CFSE-positiver Zellen (rechter unterer Quadrant) bzw. CFSE<sup>low</sup>-T-Zellen (linker unterer Quadrant) sind in rot angegeben. Bei CD6-depletierten PBSC ergab sich bei allen Spendern ein ähnliches Bild (nicht gezeigt).

Somit konnte ich durch die Verfolgung der Proliferation mittels Abnahme der CFSE-Färbung über 5 Tage zeigen, dass NK-Zellen in PBSC und CD6-depletierten PBSC von 10 Spendern spezifisch nach Stimulus mit K-562 zur Proliferation angeregt werden. T- bzw. B-Zellen proliferierten im gleichen Zeitraum nicht. Im Fall der CD6-depletierten PBSC konnte ich einen statistisch signifikanten Unterschied der Proliferation von NK-Zellen nach Stimulation mit K-

## E. ERGEBNISSE

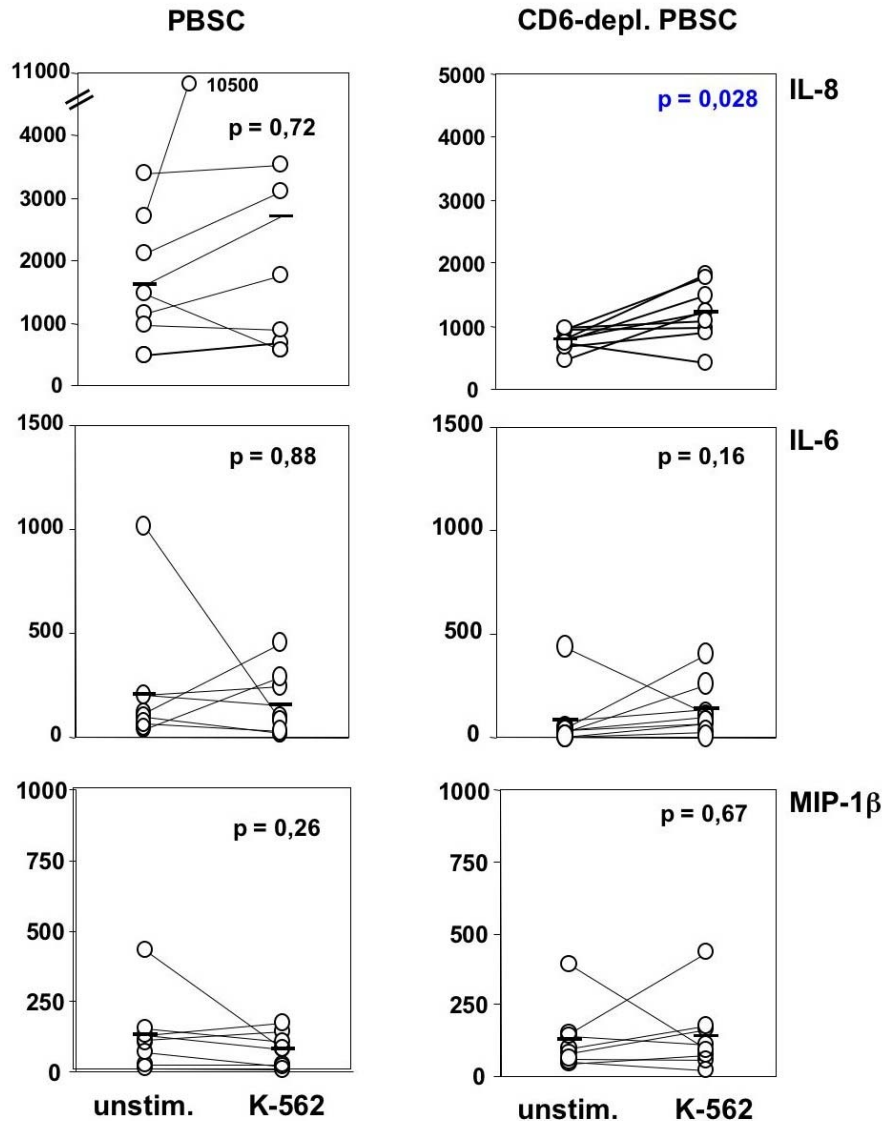
---

562 im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen sowie eine statistisch signifikante Abnahme der Proliferation nach Stimulation mit der HLA-E-Transfektante von K-562 nachweisen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen im PBSC und CD6-depletierten PBSC nach Stimulation mit K-562-Zellen, im Gegensatz zu T-Zellen und B-Zellen, innerhalb von 5 Tagen proliferieren. Weiter konnte ich zeigen, dass die bei den CD6-depletierten PBSC beobachtete statistisch signifikante Proliferation der NK-Zellen bei Stimulation mit HLA-E-Transfektanten von K-562-Zellen statistisch signifikant abnimmt. Die im CD6-depletierten PBSC transplantierten NK-Zellen können also nach Stimulation *in vitro* proliferieren.

### **2.4.4 Freisetzung von Zytokinen bzw. Chemokinen aus Zellen der PBSC- und CD6-depletierten PBSC-Fraktion nach Stimulation mit Zielzellen**

Mit Hilfe der Multiplex-Technologie konnte das Muster an Zytokinen und Chemokinen, die von den Zellen des PBSC und CD6-depletierten PBSC insgesamt 8 unterschiedlicher Spender sezerniert wurden, bestimmt werden. Die Überstände wurden auf das Vorliegen der folgenden Zytokine/Chemokine getestet: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\beta$  und GM-CSF.  $0,2 \times 10^6$  Effektorzellen wurden mit  $20 \times 10^4$  Zielzellen für 24 Stunden in einem Volumen von 200  $\mu$ l inkubiert und davon 50  $\mu$ l Überstand zur Quantifizierung der Zytokine bzw. Chemokine abgenommen. Die Menge der sezernierten Zytokine bewegte sich im Bereich von 40 – 1000 pg/ml (IL-6), 400 – 10500 pg/ml (IL-8) und 10 – 400 pg/ml (MIP-1 $\beta$ ) für PBSC und CD6-depletierte PBSC.



**Abbildung E2.17:** Zytokinsekretion der PBSC und CD6-depletierten PBSC aus 8 Spendern. Gezeigt ist die Menge an sezerniertem Zytokin/Chemokin in pg/ml nach Abzug des Hintergrunds durch das Medium und die Stimulatorzellen. Die Berechnung der angezeigten Signifikanzwerte erfolgte nach Wilcoxon. Das Symbol – steht für den Mittelwert.

Die CD6-depletierte Fraktion zeigt im Fall der Freisetzung von IL-8 eine statistisch signifikante Korrelation ( $p = 0,028$ ) zur Stimulation mit K-562-Zellen (Abbildung E2.17). Interessanterweise wurde im Fall von IL-8 bei den undepletierten Stammzellpräparaten eine große Streuung in Bezug auf die Menge an sezerniertem Zytokin bei den verschiedenen Spendern beobachtet (559 pg/ml – 10508 pg/ml, nach Stimulation mit K-562 für 24h). Betrachtet man den Spender mit der größten Menge an sezerniertem IL-8 nach Stimulation, so konnte ich beim entsprechenden undepletierten Stammzellpräparat (PBSC) 10508 pg/ml nachweisen und beim CD6-depletierten Präparat desselben Spenders 1466 pg/ml. Berechnet man den Mittelwert aus allen Spenderpräparaten kommt es bei der Freisetzung

## E. ERGEBNISSE

von IL-8 nach Stimulation mit K-562-Zellen im Vergleich zwischen PBSC und CD6-depletiertem PBSC zu einer Verringerung der Menge an freigesetztem Zytokin bzw. Chemokin. Bei IL-6 erkennt man eine leicht verringerte, bei MIP1- $\beta$  eine geringfügige Zunahme der Menge an sezerniertem Zytokin bzw. Chemokin (Tabelle T2.5).

Effektor	PBSC		CD6-depl. PBSC	
Zytokin/Chemokin	unstim.	stim. K562	unstim.	stim. K562
IL-6	203,7	154,3	73,2	128,1
IL-8	1592,3	2695,1	773,5	1196,7
MIP-1 $\beta$	128,5	78,5	124,7	138,8

**Tabelle T2.5:** Mittelwerte der Menge an freigesetztem Zytokin/Chemokin in pg/ml von n = 8 Spendern. Gezeigt sind die Mittelwerte der PBSC- und CD6-depletierten PBSC-Präparate von 8 Spendern unstimuliert (unstim.) und nach Stimulation mit K-562.

Im Fall der anderen untersuchten Zytokine bzw. Chemokinen (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und GM-CSF) konnte bei keinem der untersuchten Spender eine signifikante Sekretion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Durch die Zellen der PBSC- und CD6-depletierten PBSC werden nach Stimulation mit Zielzellen vermehrt die Zytokine IL-6, IL-8 und MIP-1 $\beta$  sezerniert. Im Fall der CD6-depletierten PBSC lässt sich bei IL-8 eine statistisch signifikante Zunahme des Chemokins nach Stimulation mit K-562-Zellen nachweisen. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die generelle Zytokinfreisetzung durch Stimulation mit Zielzellen nicht durch die Veränderung des NK-Repertoires aufgrund CD6-Depletion beeinflusst wird. Mit der detaillierten phänotypischen und funktionellen Untersuchung der NK-Zellen vor und nach Depletion durch den CD6-Marker lässt sich feststellen, dass eine statistisch signifikante Verschiebung des Repertoires mit Abreicherung der KIR-positiven NK-Zellen bei allen untersuchten Präparaten vorlag. Dies ist jedoch nur mit einer geringen funktionellen Veränderung der NK-Zellen verknüpft.

### 2.5 Einfluss des HLA-C- und KIR-Genotyps auf den klinischen Verlauf nach Transplantation

#### 2.5.1 HLA-C- und KIR-Typisierung der Spender-Patienten-Kombinationen

Velardi et al. postulieren, dass bei der haploidentischen Stammzelltransplantation alloreaktive NK-Zellen einen großen Einfluss auf den klinischen Verlauf haben können (Ruggeri, Capanni et al. 2002). Die Alloreaktivität ergibt sich aus einer „Fehlanpassung“ der inhibierenden KIR-Rezeptoren, die auf den Spender NK-Zellen exprimiert sind in Bezug auf ihre Liganden, d.h. HLA-Klasse-I-Moleküle auf Empfängerzellen, insbesondere auf Leukämiezellen des Empfängers. Dabei spielen die auf den Empfängerzellen exprimierten HLA-C-Moleküle eine herausragende Rolle (Ruggeri, Capanni et al. 1999; Ruggeri, Capanni et al. 2005; Ruggeri, Mancusi et al. 2005). Dieses Modell wird auch als „KIR-Ligand-Mismatch-Modell“ oder „Ligand-Ligand-Modell“ bezeichnet.

NK-Zell-Alloreaktivität ergibt sich also dann zwischen zwei Individuen, wenn eine Fehlanpassung in Bezug auf die KIR-Liganden vorliegt. In Individuen, die beispielsweise beide HLA-C-Allele aus der Gruppe 2 (Cw2, 4, 5, 6) (Gruppe 2: gekennzeichnet durch einen Asparaginrest an Position 77 und Lysin an Aminosäureposition 80 [HLA-C<sup>Asn77/Lys80</sup>]) und NK-Zellen besitzen, die den für HLA-C-Allele der Gruppe 2 spezifischen KIR haben (KIR2DL1) sind potentiell alloreaktiv gegenüber Zellen aus Individuen, die keine HLA-C-Allele dieser Gruppe 2 exprimieren, also homozygot für HLA-C Gruppe 1 sind, da der inhibierende KIR (KIR2DL1) keinen Liganden findet. Dann überwiegen aktivierende Signale und die NK-Zellen werden aktiviert. Dies gilt auch im umgekehrten Fall, in dem der Spender HLA-C-Allele der Gruppe 1 besitzt und daher NK-Zellen mit den Rezeptoren KIR2DL2/3 und der Empfänger gleichzeitig homozygot für HLA-C-Allele der Gruppe 2 wäre. Genetisch gesehen ist also immer dann mit einer Alloreaktivität (nach Velardi) von Spender NK-Zellen zu rechnen, wenn der Spender heterozygot in Bezug auf HLA-C-Allele ist (d.h. HLA-C Gruppe 1 und Gruppe 2 Allele gleichzeitig besitzt) und der Empfänger hingegen homozygot für Gruppe 1 bzw. Gruppe 2 der HLA-C-Allele ist. Basierend auf der „missing-self-Hypothese“ von Kärre et al. (Ljunggren and Kärre 1990) kann man allerdings auch argumentieren, dass es bei Fehlen des inhibierenden Rezeptors für eine HLA-C-Allelgruppe durch aktivierende KIR-Rezeptoren (deren Liganden bis heute nicht genau identifiziert sind) zu einer Alloreaktivität kommt (Ligand-Ligand-Modell).

Ich konnte im Zuge dieser Arbeit die HLA-C-Allele von 74 Spender-Patientenkombinationen mittels des LABType™ SSO-Verfahrens hoch auflösend bestimmen und mittels der KIR-SSO-Genotypisierung die jeweiligen KIR-Haplotypen bestimmen. Dazu wurden DNS-Proben aus dem Blutdepot der III.Medizinischen Klinik der LMU in Großhadern bezogen bzw. aus

## E. ERGEBNISSE

---

Zellen der Spender bzw. Empfänger DNS isoliert. Die Proben wurden in Bezug auf den HLA-C-Genotyp und KIR-Genotyp untersucht und mittels der Software HLA-Visual (Version 1.1.1 von OneLambda) ausgewertet. Nach HLA-C-Typisierung wurden die Spender (gekennzeichnet durch den Buchstaben D nach der jeweiligen Spendernummer in Tabelle I.4, Anhang) und zugehörigen Empfänger aufgrund ihrer HLA-C-Allele in vier Gruppen eingeteilt. Folgende Kombinationen sind in Bezug auf HLA-C-Allele möglich:

- |             |          |   |
|-------------|----------|---|
| <b>I:</b>   | Patient: | heterozygot, d.h. HLA-C-Allele = C1/C2          |
|             | Spender: | homozygot, d.h. HLA-C-Allele = C1/C1 oder C2/C2 |
| <b>II:</b>  | Patient: | homozygot, d.h. HLA-C-Allele = C1/C1 oder C2/C2 |
|             | Spender: | heterozygot, d.h. HLA-C-Allele = C1/C2          |
| <b>III:</b> | Patient: | homozygot, d.h. HLA-C-Allele = C1/C1 bzw. C2/C2 |
|             | Spender: | homozygot, d.h. HLA-C-Allele = C1/C1 oder C2/C2 |
| <b>IV:</b>  | Patient: | heterozygot, d.h. HLA-C-Allele = C1/C2          |
|             | Spender: | heterozygot, d.h. HLA-C-Allele = C1/C2          |

Von den 74 untersuchten Kombinationen fielen 12 in die Gruppe I (16,2%), 13 in die Gruppe II („KIR-Ligand-Mismatch“, 17,6%), 32 in die Gruppe III (43,2%) und 17 in die Gruppe IV (23%). Die vier Gruppen sind in der nachfolgenden Tabelle (T2.6) farblich kodiert, d.h. I = grün, II = orange, III = gelb, IV = türkis. In Bezug auf HLA-C-Gruppen homozygote Patienten sollten also nach Transplantation mit einem in Bezug auf die HLA-C-Gruppen heterozygoten Spender bedingt durch eine mögliche NK-Zell-Alloreaktivität einen Überlebensvorteil besitzen. Dies wären Spender-Patienten-Kombinationen, die in die oben genannte Gruppe II fallen (Patient homozygot, Spender heterozygot in Bezug auf HLA-C-Gruppe 1 und 2 Allele). Insgesamt 13 Patienten des Kollektivs gehörten dieser Gruppe II an, die gemäß der Hypothese von Velardi et al. von den möglicherweise alloreaktiven NK-Zellen des Spenders profitieren würden (Perugia-Gruppe). Bei den meisten von mir untersuchten Kombinationen waren Spender und Patient jedoch homozygot in Bezug auf die HLA-C-Gruppen (n = 32), wiesen also keine „KIR-Ligand-Mismatch-Situation“ auf (Tabelle T2.6).



## E. ERGEBNISSE

HLA-C-Kombination	Patient	Spender	Anzahl (%)
I	heterozygot	homozygot	12 (16,2)
II	homozygot	heterozygot	13 (17,6)
III	homozygot	homozygot	32 (43,2)
IV	heterozygot	heterozygot	17 (23)
			n = 74

**Tabelle T2.6:** Einteilung der 74 untersuchten Spender-Patienten-Kombinationen in die 4 verschiedenen Kombinationen in Bezug auf die HLA-C-Gruppen.

In Bezug auf den KIR-Haplotyp wurden die 72 Spender und dazugehörigen Patienten dem jeweiligen KIR-Haplotyp aufgrund der Anzahl ihrer aktivierenden KIR-Gene zugeteilt. Im humanen KIR-Lokus sind 16 Gene kodiert, wobei im Haplotyp A nur ein aktivierendes KIR-Gen (*KIR2DS4*) vorhanden ist. Die anderen aktivierenden KIR-Gene (*2DS1*, *2DS2*, *3DS1* und *3DS2*) fehlen bei diesem Haplotyp. Dagegen können die Haplotypen B unterschiedliche Kombinationen aus aktivierenden KIR besitzen. Daraus ergibt sich eine große Heterogenität bzgl. des Gehalts an aktivierenden KIR-Genen bei den Spendern in diesem Transplantationsprotokoll. Die Einteilung nach den Haplotypen A/A, A/B und B/B erfolgte gemäß Tabelle I.1 (siehe Anhang). Dabei sind für den Spender bzw. Patienten folgende KIR-Genotypen möglich: homozygot A/A, heterozygot A/B und homozygot B/B, wobei homozygot BB die größte Anzahl an aktivierenden KIR-Rezeptoren auf NK-Zellen aufweisen würde.

KIR-Haplotyp	A/A	A/B	B/B
Spender	24 (33,3%)	42 (58,3%)	6 (8,3%)
Patienten	25 (34,7%)	38 (53%)	9 (12,3%)

**Tabelle T2.7:** Zahl der Spender bzw. Patienten mit A/A, A/B bzw. B/B Haplotyp der untersuchten 72 Kombinationen und Prozent Anteil an der Gesamtzahl der Spender (n = 72) und Empfänger (n = 72).

Aus Tabelle T2.7 geht hervor, dass ca. 33% der Spender und ca. 34% der Empfänger der untersuchten Gruppe einen KIR Haplotyp A/A besitzen. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass ca. 30% der kaukasischen Bevölkerung diesen Haplotyp aufweisen (Khakoo and Carrington 2006). Das Gen *KIR2DS4* wurde in 98% aller untersuchten Personen gefunden, was sich mit den Angaben aus der Literatur in Bezug auf die Häufigkeit des Fehlens von *KIR2DS4* in der kaukasischen Bevölkerung deckt. Bei dieser Betrachtung wurde nicht zwischen dem Wildtyp-Allel (\*001) und den Deletionsallelen (Null-Allele:

## E. ERGEBNISSE

\*003/4/6) unterschieden. 84% der kaukasischen Bevölkerung tragen laut Publikationen von Hsu et al. und Maxwell et al. die Null-Allele (Hsu, Liu et al. 2002; Maxwell, Wallace et al. 2002).

Die am häufigsten gefundenen inhibitorischen Gene waren *KIR3DL2* (100%) und das Pseudogen *KIR3DL3* (100%), *KIR2DL3* (84%), während *KIR2DL2* (45%) und *KIR2DL5* (41,5%) weniger häufig vorlagen. Bei den aktivierenden KIR-Genen konnte *2DS2* (48%) am häufigsten gefunden werden, gefolgt von *3DS1* (32%), *2DS1* (28%), *2DS3* (26%) und *2DS5* (21%). Auch dies deckt sich mit Angaben in der Literatur (Gagne, Brizard et al. 2002; Uhrberg, Parham et al. 2002). Der Mittelwert der Anzahl der aktivierenden KIRs lag bei allen untersuchten Proben bei 2 (Bereich 0 – 5), bei den Spendern allein bei 2,15 (Bereich 0 – 5).

Anzahl Spender-Patienten-Kombinationen (n = 72)	A/A	A/B	B/B	Patienten
<b>Spender</b>	<b>23</b>	<b>43</b>	<b>6</b>	
<b>Patient A/A</b>	13	11	1	<b>25</b>
<b>Patient A/B</b>	8	25	5	<b>38</b>
<b>Patient B/B</b>	2	7	0	<b>9</b>

**Tabelle T2.8:** Anzahl der verschiedenen KIR-Haplotypen von 72 Spendern und 72 Patienten (orange Schrift) sowie die Anzahl der jeweiligen Kombinationen des Haplotyps des Spenders und des korrespondierenden Patienten. So hatten beispielsweise insgesamt 13 der Patienten mit einem Haplotyp A/A in Bezug auf die KIR-Gene einen Spender mit demselben Haplotyp A/A.

In Tabelle T2.8 ist die jeweilige Anzahl der gefundenen KIR-Haplotypen der Spender und Patienten gezeigt (orange Schrift) und gleichzeitig die Anzahl der identifizierten Kombinationen der Haplotypen des Spenders und korrespondierenden Patienten. Am häufigsten wurde die Kombination eines Spenders mit Haplotyp A/B und eines Patienten mit demselben Haplotyp (A/B) gefunden (n = 25, 35%).

### 2.5.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Für die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit gemäß Kaplan-Meier-Schätzer in Abhängigkeit von der HLA-C- bzw. KIR-Genetik wurden in Abstimmung mit Prof. Dr. H-J. Kolb ausschließlich solche Patienten ausgewählt, die nur eine Transplantation nach dem CD6-Protokoll erhalten hatten (n = 51). Alle anderen Patienten wurden zuvor schon einmal mittels autologer oder allogener Transplantationen behandelt und daher aus der

## E. ERGEBNISSE

vorliegenden statistischen Betrachtung ausgeschlossen. Der Kaplan-Meier-Schätzer dient der Einschätzung der Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Versuchsobjekt ein bestimmtes Ereignis innerhalb eines Zeitintervalls *nicht* eintritt (Formel F2.1). Die Bestimmung der statistischen Signifikanz (p) erfolgte gemäß Log-Rank-Test.

$$\hat{S}(t) = \prod_{t_{(i)} \leq t} \frac{n_i - d_i}{n_i} \quad \hat{S}(0) = 1$$

**Formel F2.1:** Kaplan-Meier-Schätzer, wobei  $d_i$  = Versuchsobjekte, bei denen das Ereignis zum Zeitpunkt  $t_{(i)}$  eingetreten ist und  $n_i$  = Versuchsobjekte zum Zeitpunkt  $t_{(i)}$  unter Risiko.

Das Patientenkollektiv (n = 51) setzte sich aus den folgenden Leukämieformen zusammen:

Leukämieform	n (%)
AML	24 (47)
ALL	14 (27)
CML	2 (4)
NHL	9 (18)
SAA	1 (2)
MDS	1 (2)
	<b>51</b>

**Tabelle T2.9:** Anzahl der jeweiligen Leukämieerkrankungen des Patientenkollektivs (n = 51). AML: akute myeloische L.; ALL: akute lymphatische L.; CML: chronisch-myeloische L.; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; SAA: schwere aplastische Anämie; MDS: Myelodysplastisches Syndrom.

Von den 51 untersuchten Patienten hatten 26 einen C1/C1, 6 einen C2/C2 und 18 einen C1C2 HLA-C-Genotyp. Die KIR-Haplotypen korrespondierenden Spender (n = 50) setzten sich folgendermaßen zusammen: 16 A/A, 30 A/B und 4 B/B. Bei einem der Spender konnte aufgrund einer Degradation der DNS keine HLA-C/KIR-Typisierung durchgeführt werden.

HLA-C-Kombination	Patient	Spender	Anzahl (%)
I	heterozygot	homozygot	7 (14)
II	homozygot	heterozygot	9 (18)
III	homozygot	homozygot	23 (46)
IV	heterozygot	heterozygot	11 (22)
			<b>n = 50</b>

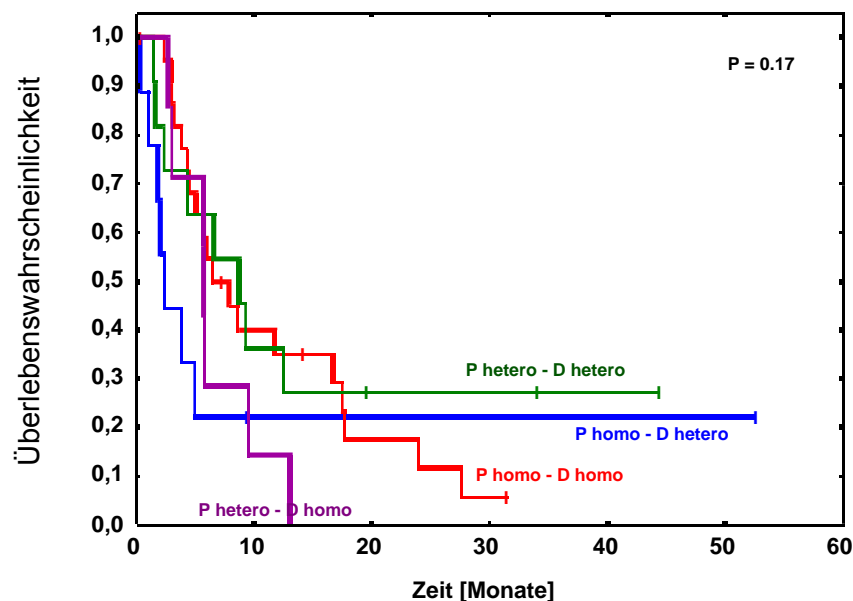
**Tabelle T2.10:** Einteilung der n = 50 dokumentierten Spender-Patienten-Kombinationen in die 4 verschiedenen Kombinationen in Bezug auf die HLA-C-Gruppen.

## E. ERGEBNISSE

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 39 Jahre ( $n = 51$ , Bereich 18 – 61), das der Spender 40 Jahre ( $n = 51$ , Bereich 17 – 73). Von den 51 Spendern waren 25 männlich und 26 weiblich, bei den Patienten 33 männlich und 18 weiblich (Daten der Klinik).

### 2.5.3 Einfluss der HLA-C-Gruppen auf das Überleben der Patienten

Das Patientenkollektiv sollte zunächst im Sinne des „KIR-Ligand-Mismatch-Modells“ auf einen möglichen Überlebensvorteil einer der in Tabelle T2.10 genannten Gruppen statistisch untersucht werden. Bei der Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit von  $n = 50$  dokumentierten Patienten bezüglich der HLA-C-Kombination zwischen Patient und Spender (Einteilung der Kombinationen siehe Tabelle T2.10) lässt sich ein Trend für einen Überlebensvorteil für HLA-C-Gruppen-heterozygote Patienten feststellen, die mit Zellen eines ebenfalls heterozygoten Spenders transplantiert wurden (Gruppe IV aus Tabelle T2.10, grüne Linie in Abbildung E2.18). Bei dieser Berechnung wurde nicht nach den Leukämieformen unterschieden.

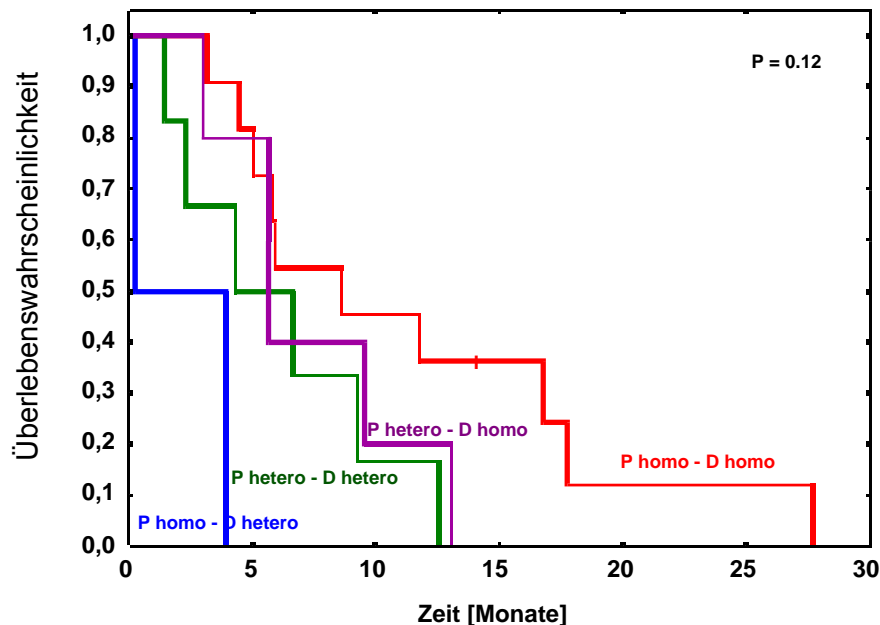


**Abbildung E2.18:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die Patienten-Spender HLA-C-Allelkombinationen. Gezeigt sind 50 Kombinationen mit Patienten unterschiedlicher Leukämieerkrankungen. P hetero – D hetero (entspricht Gruppe IV,  $n = 11$ ), P homo – D hetero Gruppe II („Perugia-Gruppe“,  $n = 9$ ), P homo – D homo Gruppe III ( $n = 23$ ) und P hetero – D homo Gruppe I aus Tabelle T2.10 ( $n = 7$ ).

Man erkennt in Abbildung E2.18, dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Kombinationen gibt. Interessanterweise zeigte ein zur „Perugia-Gruppe“ (Gruppe II, Tabelle T2.10) gehörender Patient ein Überleben von mehr als 52 Monaten (Endpunkt der blauen Linie in Abb. E2.18). Das verlängerte Überleben dieses Patienten im

## E. ERGEBNISSE

Vergleich zu den anderen Patienten ist wahrscheinlich durch andere Ursachen als die HLA-C-Gruppenzugehörigkeit bedingt. Der betreffende 50 Jahre alte Patient (X11P, w) litt unter einem MDS (Myelodysplastisches Syndrom) und zeigte weder eine akute, noch chronische GvHD. Die Erkrankung dieses Patienten wurde 1996 diagnostiziert, die Transplantation erfolgte 1998, wobei es sich beim zugehörigen Spender um den Sohn handelte. Unterscheidet man bei der Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen AML und ALL ergibt sich ein anderes Bild (Abbildungen E2.19 und E2.20).

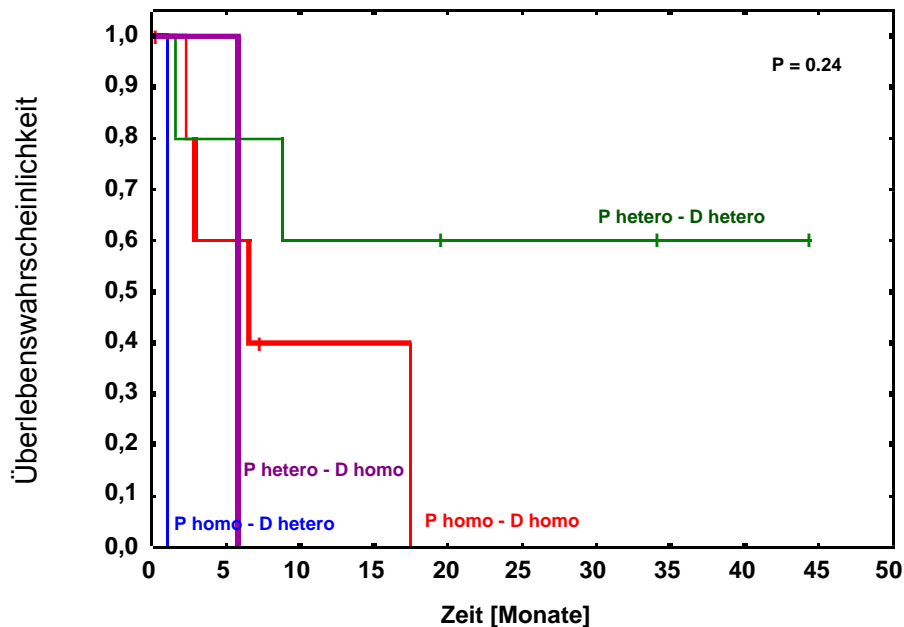


**Abbildung E2.19:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die Patienten-Spender HLA-C-Allelkombinationen der 24 AML-Patienten. P hetero – D hetero entspricht Gruppe IV (grüne Linie, n= 6), P homo – D hetero Gruppe II („Perugia-Gruppe“, blaue Linie, n = 2), P homo – D homo Gruppe III (rote Linie, n = 11) und P hetero – D homo Gruppe I (violette Linie, n = 5) aus Tabelle T2.10.

Bei der AML zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter Vorteil ( $p = 0,12$ ,  $n = 24$ ) für homozygote Patienten, die mit Zelle eines in Bezug auf die HLA-C-Allele homozygoten Spenders transplantiert wurden (Abbildung E2.19). Dies steht im Gegensatz zur Beobachtung von Velardi et al., die für homozygote AML-Patienten einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil bei Transplantation mit Zellen eines heterozygoten Spenders gezeigt haben (Ruggeri, Capanni et al. 1999). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen meiner Arbeit haben jedoch auch einige andere Studien keinen Vorteil der möglichen Alloreaktivität von Spender NK-Zellen aufgrund der „KIR-Ligand-Fehlanpassung“ zeigen können (Davies, Ruggieri et al. 2002; Lowe, Turner et al. 2003; Bornhauser, Schwerdtfeger et al. 2004), was jedoch möglicherweise durch unterschiedliche Behandlungsprotokolle, der Zusammensetzung des Transplants und die unterschiedlichen Leukämieformen bedingt ist.

## E. ERGEBNISSE

Betrachtet man nur die ALL-Erkrankungen, so lässt sich ein statistisch nicht-signifikanter Vorteil für heterozygote Patienten beobachten, die mit Zellen eines heterozygoten Spenders transplantiert wurden (Gruppe IV, Tabelle T2.10) (Abbildung E2.20).



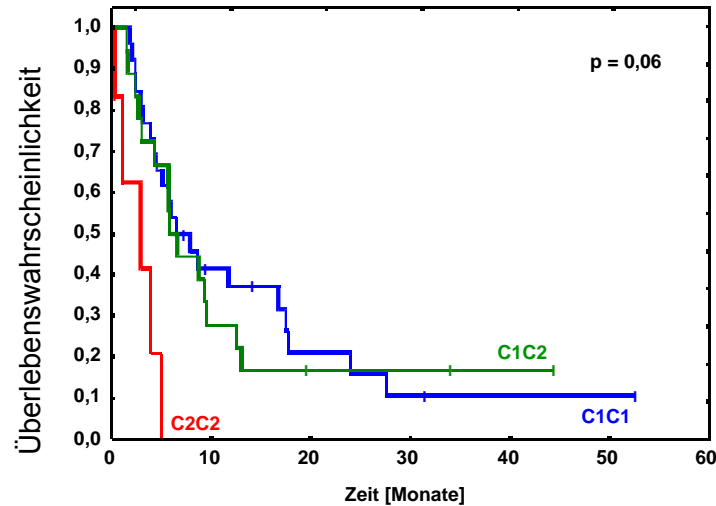
**Abbildung E2.20:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die Patienten-Spender HLA-C-Allelkombinationen. Gezeigt sind 13 Kombinationen von ALL-Patienten. P hetero – D hetero entspricht Gruppe IV (n = 5), P homo – D hetero Gruppe II („Perugia-Gruppe“, n = 1), P homo – D homo Gruppe III (n = 6) und P hetero – D homo Gruppe I (n = 1) aus Tabelle T2.10.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Einteilung der Spender-Patienten-Kombinationen in das „KIR-Ligand-Mismatch-Modell“ nach Velardi et al. kein geeignetes Mittel zur Prognose über den Ausgang der haploidentischen Transplantation liefert. Die Form der Leukämieerkrankung (AML, ALL) spielt bei der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten eine entscheidende Rolle, wobei ich zeigen konnte, dass für AML-Patienten, die in Bezug auf die HLA-C-Allele homozygot sind und mit Zellen eines homozygoten Spenders transplantiert werden, ein statistisch nicht signifikanter Vorteil gegenüber der „Perugia-Gruppe“ (Patient homozygot, Spender heterozygot) besteht. Bei ALL-Patienten zeigt sich dagegen ein statistisch nicht signifikanter Vorteil für heterozygote Patienten, die mit Zellen eines heterozygoten Spenders transplantiert wurden.

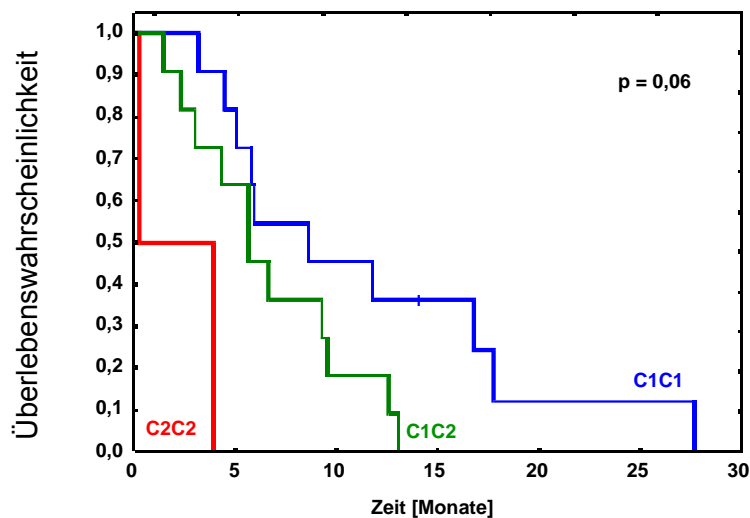
Um die Frage zu klären, ob die HLA-C-Allele des Patienten unabhängig von denen des Spenders eine Aussage über die Prognose des klinischen Verlaufs (Überleben) liefern, wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten in Bezug auf ihre HLA-C-Allele berechnet. Dabei konnte ich einen knapp nicht statistisch signifikanten ( $p = 0,06$ ;  $n = 50$ ) Überlebensvorteil für Patienten mit einem C1/C2 HLA-C-Genotyp im Vergleich zu C1/C1 und

## E. ERGEBNISSE

C2/C2 homozygoten Patienten zeigen, wenn alle Leukämieformen gleichzeitig betrachtet wurden. Patienten, welche die HLA-C-Allele C2/C2 besitzen, haben demnach die geringste Überlebenswahrscheinlichkeit aller Patienten. Die Anwesenheit zumindest eines C1-Alleles scheint eine „protektive“ Wirkung zu vermitteln (Abbildung E2.21)



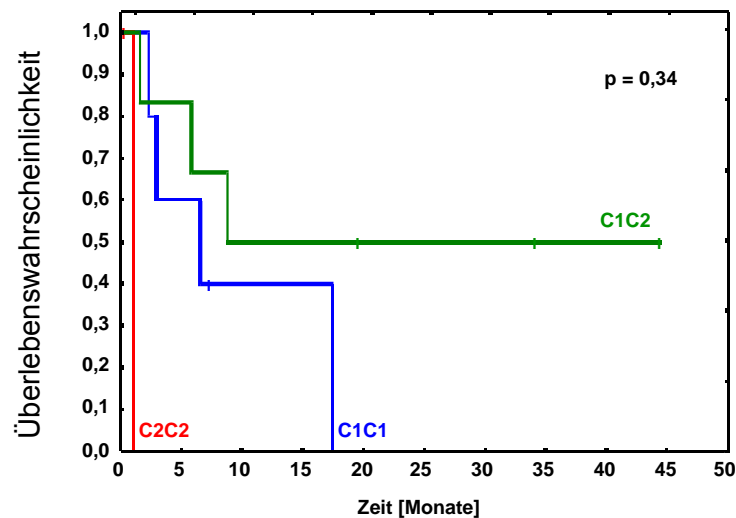
**Abbildung E2.21:** Überlebenswahrscheinlichkeit von  $n = 50$  Patienten mit unterschiedlichen Leukämieerkrankungen in Bezug auf den HLA-C-Genotyp des jeweiligen Patienten: C1/C1  $n = 26$ , C1/C2  $n = 18$  und C2/C2  $n = 6$ .



**Abbildung E2.22:** Überlebenswahrscheinlichkeit von  $n = 24$  AML-Patienten in Bezug auf den HLA-C-Genotyp des jeweiligen Patienten: C1/C1  $n = 11$ , C1/C2  $n = 11$ , C2/C2  $n = 2$ .

Betrachtet man die AML-Patienten ( $n = 24$ ) getrennt von den ALL-Patienten (Abbildung E2.22), so zeigt sich ein auffälliger statistisch nicht-signifikanter Trend bezgl. der HLA-C-Allele des Patienten. Während bei AML-Patienten der C1/C1-Genotyp die beste Überlebenswahrscheinlichkeit vermittelt, hat bei den ALL-Patienten der C1/C2-Genotyp anscheinend einen günstigeren Einfluss auf das Überleben (Abb.E2.23, Seite 128).

## E. ERGEBNISSE



**Abbildung E2.23:** Überlebenswahrscheinlichkeit von  $n = 13$  Patienten in Bezug auf den HLA-C-Genotyp des jeweiligen Patienten: C1/C1  $n = 5$ , C1C2  $n = 6$ , C2/C2  $n = 2$ .

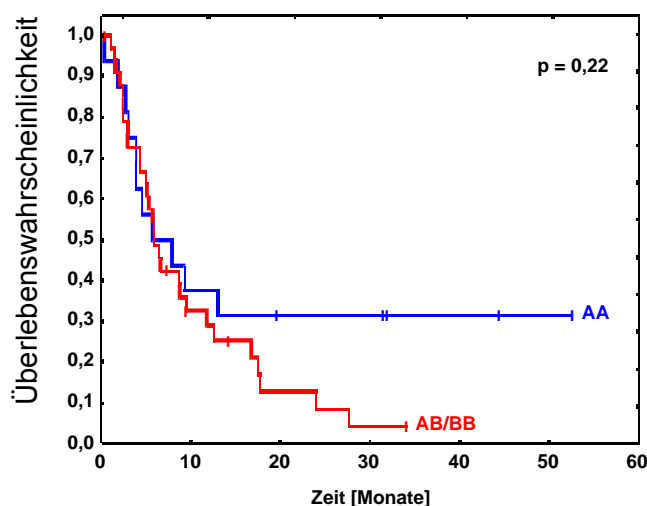
Trotz der kleineren Fallzahl bei den ALL-Patienten kann man von einer krankheitsbedingten Signifikanz dieser Beobachtung ausgehen, da auch andere Forschungsgruppen bereits eine ähnliche Verteilung gefunden haben. Dabei fällt auf, dass sich die myeloischen Erkrankungen (AML, CML) von den lymphatischen Erkrankungen (ALL, CLL) bezüglich der Genetik unterscheiden. Uhrberg et al. haben gezeigt, dass CML-Patienten, welche die HLA-C-kodierten KIR-Liganden C1/C1 aufweisen einen Überlebensvorteil gegenüber C2/C2-Patienten besitzen (Fischer, Ottinger et al. 2007). Cook et al. konnten zeigen, dass die HLA-C-Gruppen des Patienten einen Einfluss auf den Erfolg der Transplantation haben. So wurde von Cook et al. bei der HLA-angepassten Transplantation mit verwandten Spendern festgestellt, dass Patienten, die an einer myeloischen Erkrankung litten und homozygot für die C2-Allele waren eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten hatten, die entweder homozygot C1 oder heterozygot C1/C2 waren (Cook, Milligan et al. 2004).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass solche Patienten, die gemäß der „KIR-Ligand-Mismatch-Situation“ nach Velardi (Patient homozygot, Spender heterozygot in Bezug auf die HLA-C-Gruppen 1 und 2) transplantiert wurden beim Behandlungsprotokoll nach Kolb mit CD6-Depletion keinen Überlebensvorteil gegenüber den anderen Patienten besitzen. Je nach Erkrankung, also AML oder ALL (myeloisch bzw. lymphatisch) zeichnet sich ein statistisch nicht-signifikanter Trend zum längeren Überleben bei C1/C1-AML-Patienten bzw. C1/C2-ALL-Patienten ab.



### 2.5.4 Einfluss der KIR-Haplotypen des Spenders auf das Überleben der Patienten

Neben der Betrachtung der KIR-Liganden, bzw. des “KIR-Ligand-Mismatch” (Velardi) stellt sich die Frage, ob der KIR-Haplotyp des Spenders einen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Leukämieerkrankungen nach haploidentischer Transplantation hat. Dieses Modell würde sich also auf die KIR-Rezeptoren des Spenders beziehen. Analog zu den HLA-C-Gruppen wurde in einem ersten Schritt die Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die KIR-Haplotypen (A/A vs A/B und B/B zusammengefasst) der Spender für alle Leukämieformen berechnet. Ein Vergleich der Spendergruppen A/A versus A/B bzw. B/B liegt nahe, da Individuen mit einem A/A-Haplotyp maximal einen aktivierenden KIR-Rezeptor (KIR2DS4) besitzen, der in einigen Fällen sogar homo- oder heterozygot eine Deletion in Exon 5 tragen kann. Individuen mit einem A/B- bzw. B/B-Haplotyp besitzen dagegen in jedem Fall mehr als 3 aktivierende KIR-Gene und wurden daher einer gemeinsamen Gruppe zugeordnet.

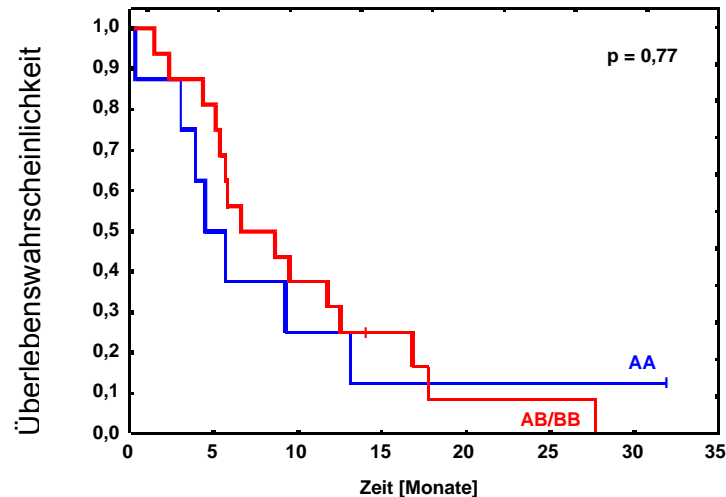


**Abbildung E2.24:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Monaten von  $n = 50$  Patienten mit unterschiedlichen Leukämieerkrankungen (AML, ALL, NHL usw.) in Bezug auf den KIR-Haplotyp des Spenders. Blaue Kurve: KIR-Haplotyp des Spenders A/A ( $n = 16$ ), rote Kurve, KIR-Haplotyp A/B und B/B ( $n = 34$ ).

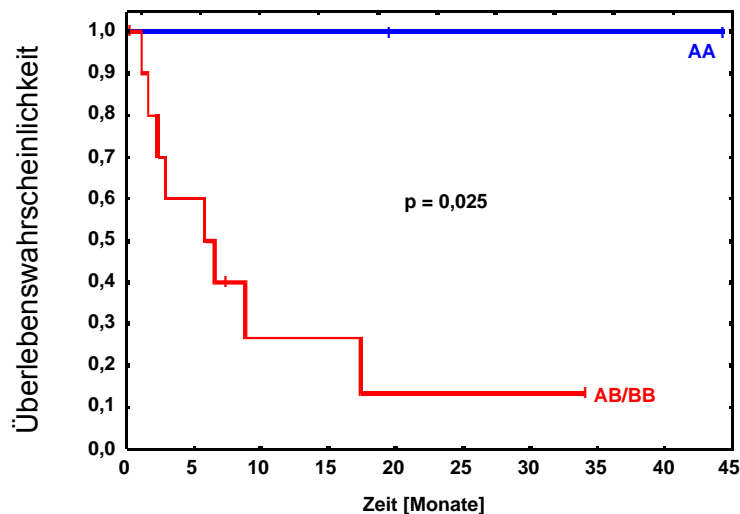
Bei einer Stichprobenzahl von  $n = 50$  ergab sich ein statistisch nicht signifikanter ( $p = 0,22$ ,  $n = 50$ ) Trend zu einem Überlebensvorteil für Patienten, die mit Zellen eines Spenders mit dem KIR-Haplotyp A/A transplantiert wurden (Abbildung E2.24). In einer weiteren Kaplan-Meier-Schätzung wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten in Bezug auf den KIR-Haplotyp des Spenders nach Aufgliederung in AML- ( $n = 24$ ) und ALL- ( $n = 13$ ) Erkrankungen berechnet. Dabei zeigte sich im Fall von Patienten mit einer AML-Erkrankung kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,77$ ,  $n = 24$ ) zwischen einer Transplantation mit einem Spender, der den KIR-Haplotyp A/A aufwies und einer Transplantation mit einem Spender, der den KIR-Haplotyp A/B oder B/B hatte (Abbildung E2.25). Im Fall von Patienten

## E. ERGEBNISSE

mit einer ALL-Leukämieerkrankung konnte dagegen ein statistisch signifikanter Vorteil bei der Transplantation von Spenderzellen mit einem KIR-Haplotyp A/A gegenüber A/B und B/B gezeigt werden, wobei die Fallzahl bei KIR-Haplotyp A/A des Spenders bei gerade 2 lag. Dieses Ergebnis ist somit unter Vorbehalt zu betrachten (Abbildung E2.26).



**Abbildung E2.25:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Monaten von n = 24 AML-Patienten in Bezug auf den KIR-Haplotyp der Spender. Blaue Kurve: KIR-Haplotyp A/A (n = 8), rote Kurve KIR-Haplotyp A/B und B/B (n = 16) des Spenders.



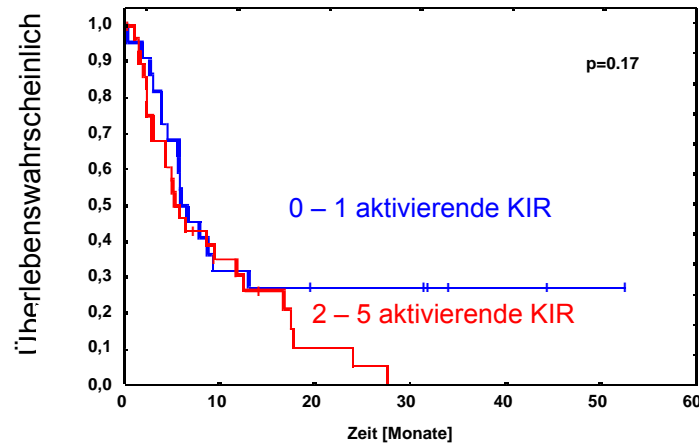
**Abbildung E2.26:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Monaten von n = 13 ALL-Patienten in Bezug auf den KIR-Haplotyp der Spender. Blaue Kurve: KIR-Haplotyp A/A (n = 2) rote Kurve, KIR-Haplotyp A/B und B/B (n = 11) des Spenders.

### 2.5.5 Einfluss der Anzahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren des Spenders auf das Überleben der Patienten

Setzt man die Anzahl an potentiell exprimierten aktivierenden KIR-Rezeptoren auf Spender-NK-Zellen in Relation zur Überlebenswahrscheinlichkeit, ergibt sich in Bezug auf alle

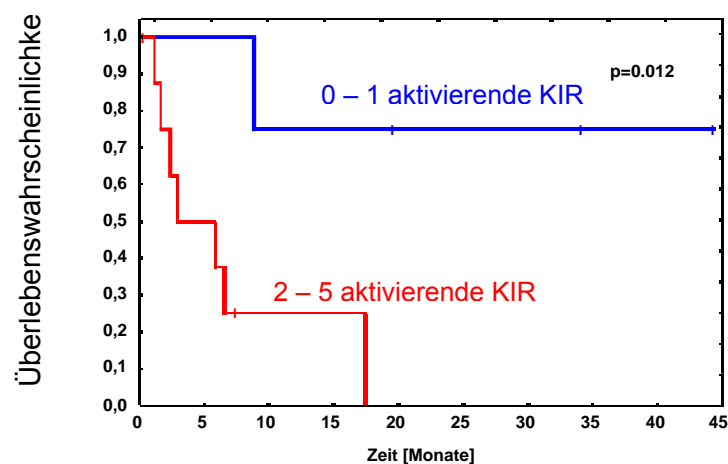
## E. ERGEBNISSE

Leukämie-Erkrankungen zusammen eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit, die jedoch nicht statistisch signifikant ist ( $p = 0,17$ ,  $n = 51$ ), wenn der Spender 0 – 1 Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren aufweist und damit den Haplotyp A/A besitzt (blaue Linie in Abbildung E2.27).



**Abbildung E2.27:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Monaten von  $n = 51$  Patienten mit unterschiedlichen Leukämieformen in Bezug auf die Anzahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren des Spenders. Blaue Kurve: 0 – 1 Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren ( $n = 22$ ) rote Kurve, 2 – 5 Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren (29).

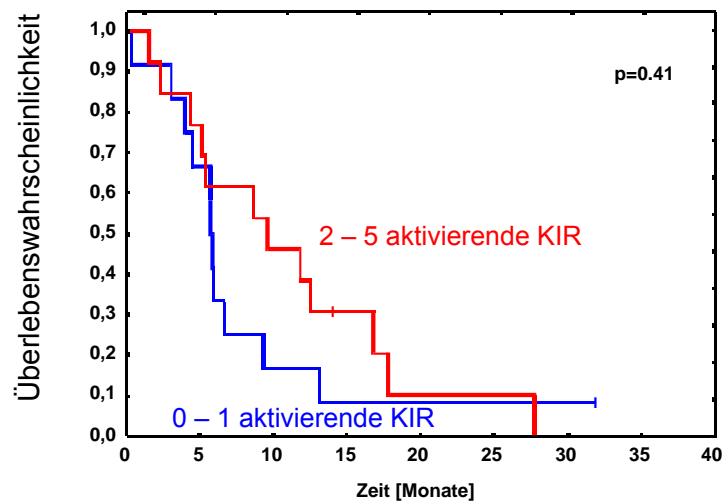
Berechnet man die Signifikanz für AML und ALL-Erkrankungen getrennt voneinander, so ergibt sich im Fall der ALL-Leukämien ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil ( $p = 0,012$ ,  $n = 13$ ) für Patienten, deren Spender 0 – 1 Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren aufweisen im Vergleich zu Patienten, deren Spender 2 – 5 Gene für aktivierende KIRs aufweisen (Abbildung E2.28).



**Abbildung E2.28:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Monaten von  $n = 13$  ALL-Patienten in Bezug auf die Anzahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren des Spenders. Blaue Kurve: 0 – 1 Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren ( $n = 4$ ), rote Kurve, 2 – 5 Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren ( $n = 9$ ).

## E. ERGEBNISSE

Bei  $n = 25$  AML-Patienten konnte hingegen kein Überlebensvorteil abhängig von der Anzahl der putativ exprimierten aktivierenden KIR-Rezeptoren auf Spender-NK-Zellen beobachtet werden ( $p = 0,41$ ,  $n = 25$ ) (Abbildung E2.29).



**Abbildung E2.29:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Monaten von  $n = 25$  AML-Patienten in Bezug auf die Anzahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren des Spenders. Blaue Kurve: 0 – 1 Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren ( $n = 12$ ), rote Kurve, 2 – 5 Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren ( $n = 13$ ).

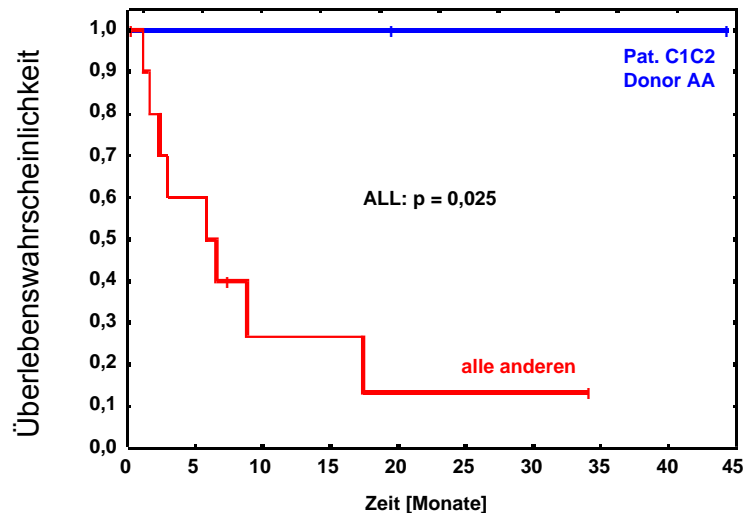
Die Beobachtung, dass sich im Fall der ALL-Patienten ein verbessertes Überleben ergibt, wenn der Spender keinen oder nur einen aktivierenden KIR-Rezeptor (KIR2DS4) besitzt, wirft die Frage auf, ob die hypothetische geringere Aktivierbarkeit (und damit Alloreaktivität der NK-Zellen) des KIR-Haplotyps A mit maximal einem aktivierenden KIR-Rezeptor durch andere noch unbekannte Faktoren aufgehoben wird. NK-Zellen, denen ein Teil der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren fehlt, sollten zumindest theoretisch in Bezug auf ihre Aktivierbarkeit keinen Überlebensvorteil für den Patienten haben. Interessanterweise ergab die Bewertung der Patienten bezüglich ihrer eigenen KIR-Haplotypen keinen Hinweis auf einen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit (Daten nicht gezeigt).

### 2.5.6 Kombination der HLA-C-Allele des Patienten mit den KIR-Genen des Spenders

Aus den Berechnungen der Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf den KIR-Haplotyp des Spenders wurde offensichtlich, dass der KIR-Haplotyp A/A des Spenders nur für ALL-Patienten einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil birgt. Bei den AML-Formen zeigte sich zwar ein Trend zu einem verbesserten Überleben bei Transplantation mit einem A/A-Spender, der jedoch keiner statistischen Signifikanz unterlag (Abbildungen E2.25 und E2.26). Ein ähnliches Bild konnte bei Betrachtung der Anzahl der aktivierenden KIR-Gene des Spenders beobachtet werden (Abbildungen E2.28 und E2.29). In einem weiteren

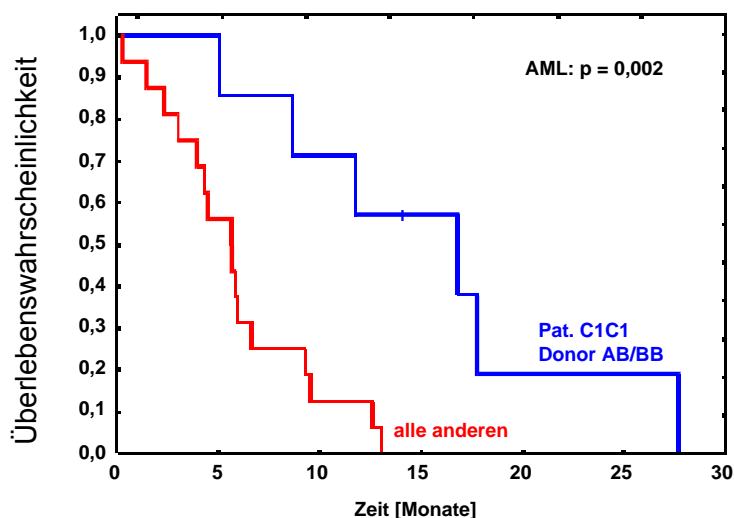
## E. ERGEBNISSE

Rechenmodell sollte das Überleben der Patienten in Bezug auf den KIR-Haplotyp des Spenders und gleichzeitig der HLA-C-Allele des Patienten betrachtet werden. Die Patienten wurden dazu aufgrund ihrer Leukämieform und bzgl. des Spender Haplotyps und der HLA-C-Allele des Patienten eingeteilt.



**Abbildung E2.30:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Monaten von  $n = 13$  ALL-Patienten in Bezug auf den KIR-Haplotyp des Spenders und der HLA-C-Allele des Patienten. Blaue Kurve: Spender KIR-Haplotyp A/A und Patient HLA-C-Allele C1/C2 ( $n = 2$ ), rote Kurve, Spender-KIR-Haplotyp A/B oder B/B, HLA-C-Allele des Patienten C1/C1 bzw. C2/C2 ( $n = 11$ ).

Abbildung E2.30 zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeit von  $n = 13$  ALL-Patienten in Bezug auf den KIR-Haplotyp des Spenders und die HLA-C-Allele des Patienten. Man erkennt einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil ( $p = 0,025$ ) für HLA-C C1C2, also heterozygote Patienten, die mit einem Spender mit A/A-KIR-Haplotyp transplantiert wurden. Eine nahezu spiegelbildliche Beziehung zwischen HLA-C und KIR-Genen zeigte sich bei den AML-Patienten (Abbildung E2.31).



**Abbildung E2.31:** Überlebenswahrscheinlichkeit in Monaten von  $n = 23$  AML-Patienten in Bezug auf den KIR-Haplotyp des Patienten. Blaue Kurve: KIR-Haplotyp A/B und B/B ( $n = 7$ ) rote Kurve, KIR-Haplotyp A/A. ( $n = 16$ ).

## E. ERGEBNISSE

---

Aus Abbildung E2.31 geht hervor, dass sich bei der Einteilung der Patienten in Bezug auf den KIR-Haplotyp des Spenders und gleichzeitig auf die HLA-C-Allele des Patienten im Fall der AML-Erkrankungen ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil ( $p = 0,002$ ,  $n = 23$ ), für solche Patienten, die in Bezug auf die HLA-C-Allele homozygot C1/C1 waren und einen Spender mit A/B oder B/B-KIR-Haplotyp hatten.

Zusammenfassend kann in Bezug auf den KIR-Haplotyp des Spenders gesagt werden, dass ein A/A-Haplotyp allgemein einen Trend hin zu einer größeren Überlebenswahrscheinlichkeit birgt. Im Fall der ALL-Leukämierkrankungen konnte dies sogar mit statistischer Signifikanz belegt werden ( $p = 0,025$ ), wobei ausdrücklich darauf hinzuweisen ist, dass nur zwei ALL-Patienten von den für die Berechnung herangezogenen 13 Patienten Spender mit diesem Haplotyp hatten. Auch die Anzahl der aktivierenden KIR-Gene des Spenders spielt für die Überlebenswahrscheinlichkeit von ALL-Patienten eine entscheidende Rolle. So konnte ich zeigen, dass ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil ( $p = 0,012$ ,  $n = 13$ ) für ALL-Patienten vorliegt, die mit Zellen eines Spenders transplantiert wurden der 0-1 aktivierende KIR-Gene besitzt. In einem weiteren Rechenmodell, bei dem der KIR-Haplotyp des Spenders und die HLA-C-Allele des Patienten gleichzeitig betrachtet wurden, konnte ich zeigen, dass im Fall von ALL-Erkrankungen die Kombination aus einem Spender mit dem KIR-Haplotyp A/A und einem in Bezug auf die HLA-C-Gruppen heterozygoten Patienten (C1/C2) einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil erbringt ( $p = 0,025$ ). Bei Patienten mit AML-Erkrankungen zeigte sich ein statistisch signifikanter Vorteil im Sinne des Überlebens bei homozygoten C1/C1-Patienten, die mit einem Spender transplantiert wurden, die den KIR-Haplotyp A/B oder B/B hatten. Die funktionelle Basis für die quasi spiegelbildliche Beziehung zwischen HLA- und KIR-Homo- bzw. Heterozygotie ist noch nicht bekannt.

### **2.5.7 Einfluss der HLA-C-Gruppen und Anzahl der aktivierenden KIR-Gene auf die akute GvHD der Patienten**

Mit Hilfe der dokumentierten klinischen Daten zur akuten GvHD der Patienten ( $n = 65$ ) nach Transplantation wurde der Einfluss der HLA-C-Allele (C1/C1, C1/C2 oder C2/C2) des Spenders bzw. Patienten auf den Grad der GvHD statistisch untersucht. Ca. 43% aller untersuchten Patienten zeigten eine akute GvHD der Grade 2 – 4, also eine deutlich messbare Erkrankung des Gastrointestinaltraktes, bedingt durch alloreaktive T-Zellen des Spenders. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Kröger et al. (Kröger, Binder et al. 2006).

## E. ERGEBNISSE

Spender		
HLA-C-Haplotyp	GvHD	
	0 - 1	2 - 4
C1/C1	16	14
C1/C2	15	10
C2/C2	6	2

} p = 0,535; n = 63

Patient		
HLA-C-Haplotyp	GvHD	
	0 - 1	2 - 4
C1/C1	15	17
C1/C2	17	8
C2/C2	5	3

} p = 0,2632; n = 65

**Tabelle T2.11:** HLA-C-Allele von  $n = 63$  Spendern bzw.  $n = 65$  Patienten und klinischer Grad der GvHD (0 - 1, bzw. 2 - 4) und statistische Signifikanz nach  $\chi^2$ -Test.

Aus Tabelle T2.11 geht hervor, dass weder die HLA-C-Allele des Spenders noch die des Patienten einen statistisch signifikanten Einfluss auf den Grad der GvHD-Erkrankung der Patienten nach Transplantation hat. Auch die Korrelation der Anzahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren des Spenders bzw. Patienten zeigte keine statistisch signifikante Relevanz in Bezug auf den Grad der GvH-Erkrankung der Patienten nach Transplantation (Tabelle T2.12). 32% der Patienten, die mit einem Präparat eines Spenders transplantiert wurden, der 0 – 1 aktivierenden KIR-Gene aufwies zeigten eine GvHD Grad 2 – 4 und 50% der Patienten litten an einer akuten GvHD Grad 2 – 4, die mit einem Spender transplantiert wurden, der mehr als 2 aktivierende KIR-Gene besaß.

Spender		
Anzahl aktivierender KIRs	GvHD	
	0 - 1	2 - 4
0 - 1	19	9
2 - 5	18	18
	} p = 0,1513; n = 63	

Patient		
Anzahl aktivierender KIRs	GvHD	
	0 - 1	2 - 4
0 - 1	23	13
2 - 5	14	14
	} p = 0,2644; n = 63	

**Tabelle T2.12:** Anzahl der aktivierenden KIR-Gene von  $n = 63$  Spendern bzw.  $n = 63$  Patienten und klinischer Grad der GvHD (0 - 1, bzw. 2 - 4) sowie statistische Signifikanz nach  $\chi^2$ -Test.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die HLA-C-Allele und die Anzahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren des Spenders bzw. Patienten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Grad der GvH-Erkrankung haben. Damit wurde die für die Spenderauswahl bedeutsame Beobachtung gemacht, dass auch eine Fehlanpassung bezüglich der HLA-C-Allele zwischen Spender und Patient nicht ursächlich für eine GvH-Erkrankung ist.

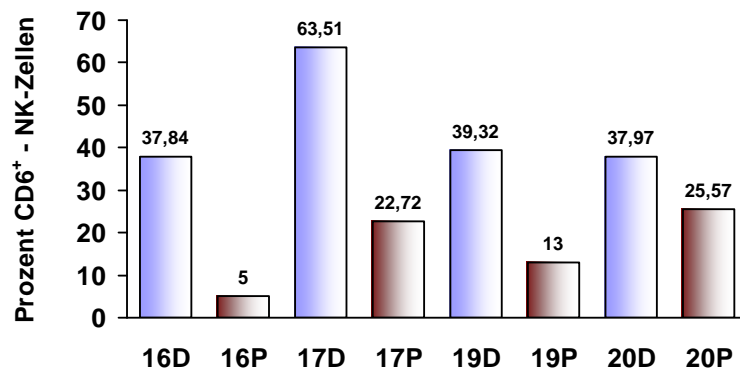
### 3. Rekonstitution der peripheren NK-Zellen in den Patienten nach Transplantation

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte die Immunrekonstitution in Patienten nach Transplantation verfolgt werden. Dazu wurden Patientenproben zu definierten Zeitpunkten nach haploidentischer Transplantation in Bezug auf die NK-Zellpopulation untersucht. Im Allgemeinen kommt es nach einer allogenen Stammzelltransplantation zuerst zu einer Rekonstitution der NK-Zellen im peripheren Blut (Bethge, Haegeler et al. 2006). NK-Zellen entwickeln sich schon nach 2 – 3 Wochen durch schnelle Differenzierung aus hämatopoetischen CD34<sup>+</sup>-Stammzellen (Anasetti, Amos et al. 1989; Lamb, Gee et al. 1998; Kalwak, Moson et al. 2003). Diese Reifung von NK-Zellen verläuft unter dem Einfluss der Mikroumgebung und der auf hämatopoetischen Zellen des Spender exprimierten KIR-Epitope und den Stromazellen des Knochenmarks des Empfängers (Roth, Carlyle et al. 2000; Cooper, Fehniger et al. 2001). Die genetische und funktionelle Basis der NK-Reifung wird derzeit kontrovers diskutiert. Im Nachfolgenden werden die FACS-Daten von 4 Patienten 180 (Patient 16P), 182 (17P), 185 (19P) und 193 Tage (20P) nach haploidentischer Transplantation erläutert. Dazu wurden Patientenproben an den genannten Zeitpunkten aufgearbeitet und mittels direkter FACS-Analyse auf die Expression der Hauptmarker CD6 und CD56 und der Rezeptoren CD94, NKG2A, NKp30, NKp44, NKp46 und KIR-Rezeptoren CD158a (p58.1, KIR2DL1), CD158b (p58.2, KIR2DL2), CD158e1 (p70, KIR3DL1) und CD158i (p50.3, KIR2DS4) hin untersucht. Gleichzeitig wurden PBSC der korrespondierenden Spender auf die Expression der genannten Oberflächenmoleküle auf NK-Zellen untersucht. Für die Auswertung wurde auf lebende Lymphozyten eingestellt, anschließend die Gesamtzahl an NK-Zellen bestimmt (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>ε</sup><sup>-</sup>) und der Prozentsatz der für die untersuchten Oberflächenmarker positiven NK-Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl an NK-Zellen berechnet.

Die Expression von CD6 auf CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen lässt sich in allen vier untersuchten Patienten um den Tag 180 nach Transplantation nachweisen. Die CD6-Expression ist jedoch im Vergleich zum Stammzellpräparat des Spenders (PBSC) bei den Patienten noch stark vermindert. Es lässt sich jedoch festhalten, dass der Patient um so mehr CD6-positive NK-Zellen nach Transplantation besitzt, je mehr CD6-positive NK-Zellen im PBSC, also vor CD6-Depletion, vorlagen (Abbildung E3.1, Seite 137). Möglicherweise ist diese Verschiebung des CD6-positiven NK-Anteils noch eine Folge der Transplantation der CD6-depletierten NK-Fraktion (siehe Abb. E2.4, Seite 103).

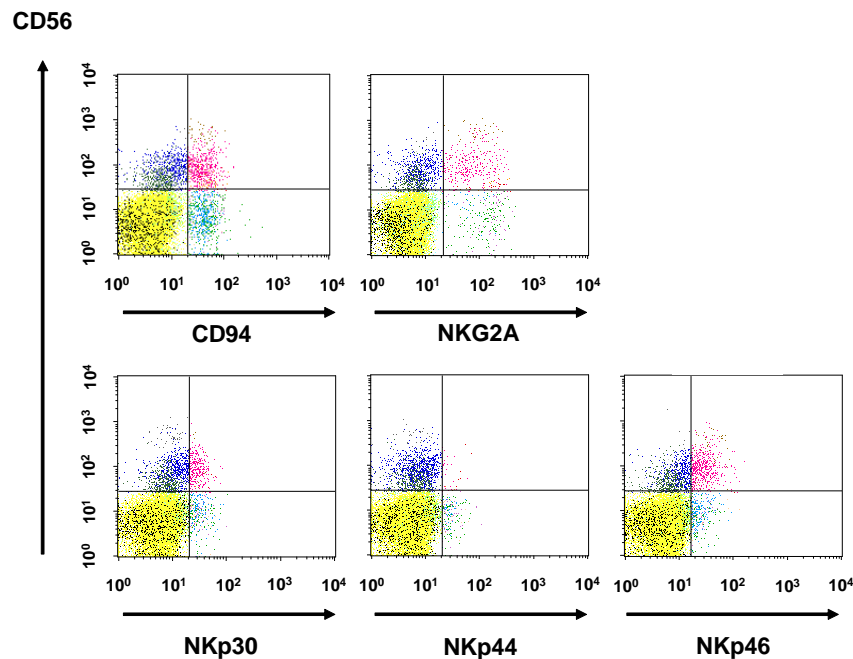


## E. ERGEBNISSE

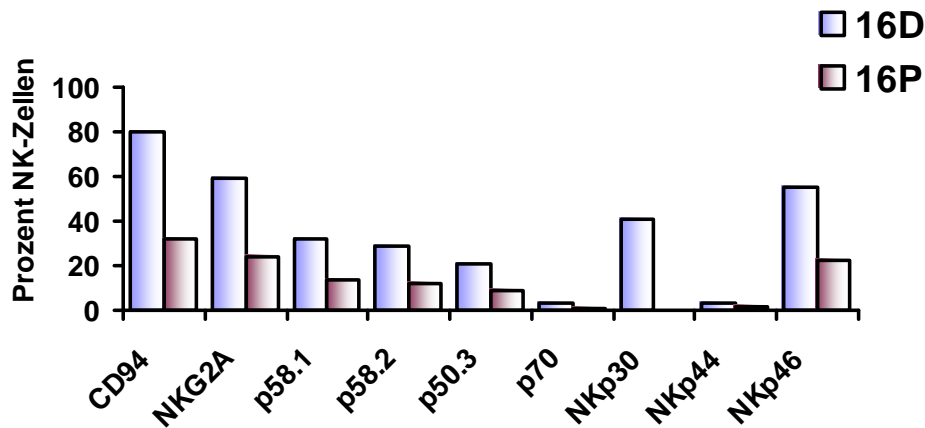


**Abbildung E3.1:** Prozent CD6-positive NK-Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der NK-Zellen. Ermittelt durch FACS-Analyse der Stammzellpräparate der Spender 16D, 17D, 19D und 20D (blaue Balken) und Analyse von Patientenproben an Tag 180 (16P), 182 (17P), 185 (19P) und 193 (20P).

Abbildung E3.2 zeigt exemplarisch die Dot-Plots eines Spenders (16D) nach Färbung mit Antikörpern gegen CD94, NKG2A sowie die NCRs NKp30, NKp44 und NKp46.



**Abbildung E3.2:** Dot-Plots der FACS-Analyse eines Spenders (16D). Gating auf lebende Zellen im SSC-H und FSC-H. Gezeigt sind die Färbungen CD56 gegen CD94, NKG2A, NKp30, NKp44 und NKp46 nach Boole-Auswertung und farbiger Kodierung der Zellpopulationen. Gelbe Zellen sind CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>-T-Zellen, blaue Zellen sind CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen, magentafarbene Zellen sind CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen, die für den jeweiligen gegengefärbten Marker positiv sind, türkis-farbige Zellen sind CD56<sup>-</sup>-Zellen, die für die jeweiligen gegengefärbten Marker positiv sind. Die in den rechten oberen Quadranten doppelt-positiven Zellen wurden in Bezug auf die Gesamtzahl aller CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen für die folgenden Diagramme in Prozent umgerechnet.

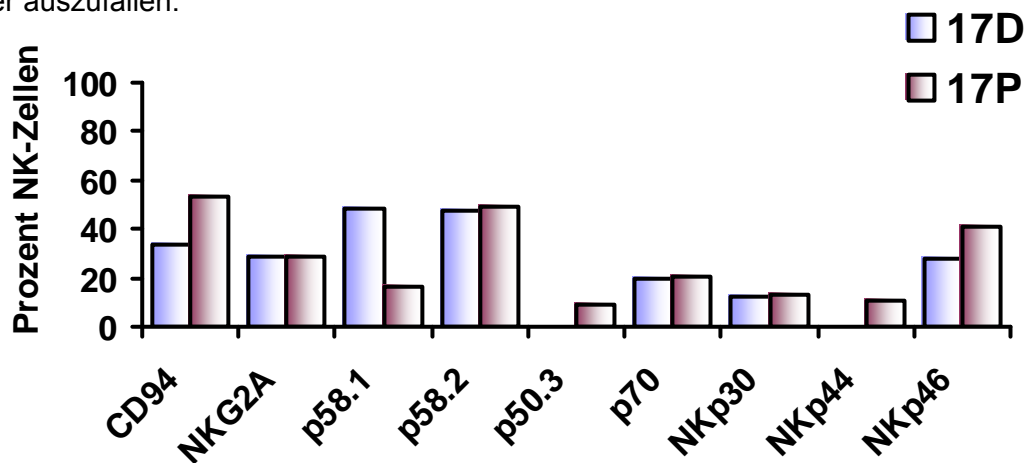


**Abbildung E3.3:** Prozent  $CD56^+CD3\varepsilon^-$ -NK-Zellen aus dem PBSC-Präparat des Spenders 16D und PBMC des Patienten 16P an Tag 180 nach Transplantation, die für die gezeigten Oberflächenproteine CD94, NKG2A, p58.1 (CD158a), p58.2 (CD158d), p50.3 (CD158i), p70 (CD158e1), Nkp30, Nkp44 und Nkp46 positiv sind.

Abbildung E3.3 zeigt den Prozentanteil  $CD56^+CD3\varepsilon^-$ -NK-Zellen des Spenders 16D sowie NK-Zellen des Patienten 16P an Tag 180 nach Transplantation, die für die gezeigten NK-Rezeptoren positiv sind. Das Muster der Oberflächenexpression der gezeigten NK-Rezeptoren des Patienten an Tag 180 nach Transplantation entspricht dem der NK-Zellen aus PBSC des Spenders vor CD6-Depletion und Transplantation, wobei der Prozentsatz der NK-Zellen, die eine Expression der Rezeptoren aufweisen allgemein verringert ist. Die rekonstituierten NK-Zellen des Patienten weisen das gleiche Muster an exprimierten KIR-Rezeptoren wie der Spender auf. Die Verhältnis der KIR-Rezeptor-positiven NK-Zellen des Spenders und des Patienten betrug im Fall von KIR2DL1 (p58.1) 0,41 und im Fall von KIR2DL2/3 (p58.2) 0,40. Ein ähnliches Verhältnis (0,4) konnte im Fall des aktivierenden Rezeptors KIR2DS4 (p50.3) und im Fall von KIR3DL1 (p70) beobachtet werden. Gleichzeitig ist der prozentuale Anteil CD94-positiver NK-Zellen 6 Monate nach Transplantation um ca. 47% im Vergleich zum Spender verringert (im Fall von NKG2A um 35,5 %). Das Verhältnis von CD94-positiven und NKG2A-positiver NK-Zellen aus dem Spender im Vergleich zum Empfänger an Tag 180 nach Transplantation beträgt somit ca. 2,5. In der Literatur ist dagegen ein starker Anstieg der Anzahl CD94/NKG2A-positiver NK-Zellen in Patienten 90 Tage nach Transplantation beobachtet worden, der möglicherweise durch die schwache Expression inhibierender KIR-Rezeptoren bedingt ist (Verhältnis in Bezug auf Spender-NK-Zellen zu Patienten-NK-Zellen) Spender zu Empfänger-Verhältnis: 0,5 nach 4 Monaten) (Nguyen, Dhedin et al. 2005). Diese Beobachtung von Nguyen et al. bezog sich allerdings auf „matched“-nicht-verwandte Spender und ist daher nur bedingt vergleichbar. Die aktivierenden NK-Rezeptoren (NCRs) Nkp30 und Nkp46 werden in Normalspenderblut auf ruhenden NK-Zellen konstitutiv exprimiert, Nkp44 nur nach Aktivierung (Moretta, Bottino et

## E. ERGEBNISSE

al. 2001). Im Fall des Patienten 16P (Tag 180 nach Transplantation) können keine NKp30-positiven NK-Zellen nachgewiesen werden. Außerdem waren nur 3,1% der Spender-NK-Zellen und 1,24% der Patienten-NK-Zellen NKp44 positiv. Dies lässt auf eine Aktivierung der Spender-NK-Zellen zum Zeitpunkt der Transplantation und der rekonstituierten Patienten-NK-Zellen 180 Tage nach Transplantation schließen. NKp46 wurde von 60% der NK-Zellen des Spenders und von 24% der NK-Zellen im Patienten nach Rekonstitution exprimiert (Verhältnis Empfänger zu Spender: 0,4). Generell erscheint der Anteil an KIR- bzw. CD94/NKG2A-, NCR-positiven NK-Zellen im Patienten nach Rekonstitution geringer als im Spender auszufallen.



**Abbildung E3.4:** Prozent  $CD56^+CD3\epsilon^-$ -NK-Zellen aus dem PBSC-Präparat des Spenders 17D und PBMC des Patienten 17P an Tag 182 nach Transplantation, die für die gezeigten Oberflächenproteine CD94, NKG2A, p58.1 (CD158a), p58.2 (CD158d), p50.3 (CD158i), p70 (CD158e1), Nkp30, Nkp44 und Nkp46 positiv sind.

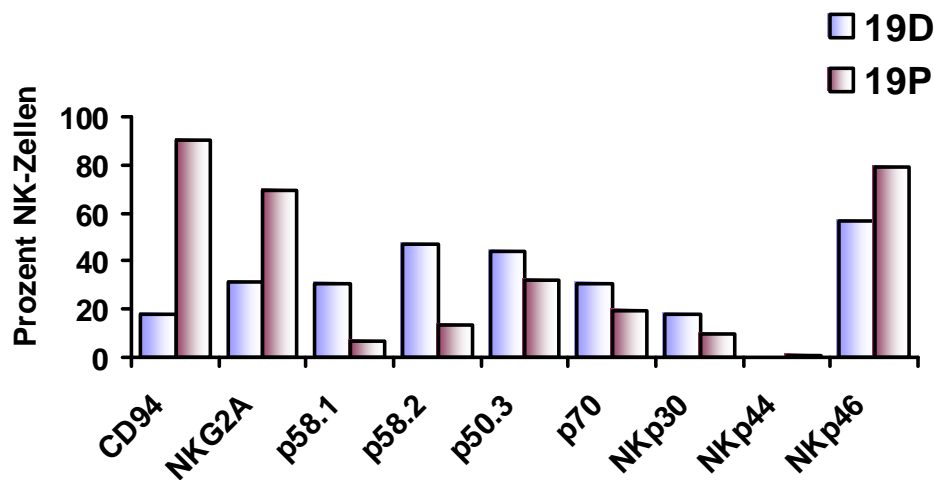
Abbildung E3.4 zeigt den relativen Prozentanteil  $CD56^+CD3\epsilon^-$ -NK-Zellen des Spenders 17D aus dem PBSC sowie NK-Zellen des Patienten 17P an Tag 182 nach Transplantation, die für die gezeigten NK-Rezeptoren positiv sind. Das Muster der Expression der untersuchten NK-Rezeptoren des Patienten unterscheidet sich hier deutlich von dem Expressionsmuster des Spenders. Auffällig sind die 9,25% KIR2DS4-positiven (p50.3) NK-Zellen des Empfängers an Tag 182 nach Transplantation und die wahrscheinlich durch Aktivierung bedingte Expression von NKp44 auf ca. 10% der Patienten-NK-Zellen. Die Expression von KIR2DL2/3 (p58.2) ist auf den Spender- und Empfänger-NK-Zellen nahezu gleich (Verhältnis Spender/Empfänger in Bezug auf p58.2: 0,96). Im Fall der Expression von KIR2DL1 (p58.1) exprimieren ca. 3-mal mehr NK-Zellen des Spenders den genannten KIR-Rezeptor im Vergleich zum Patienten nach 182 Tagen Rekonstitution.

Betrachtet man die Expression von CD94 und NKG2A im Fall des Patienten 19P 185 Tage nach haploidentischer Transplantation, so fällt im Vergleich zum Spender 19D eine starke Erhöhung des Anteils an NK-Zellen auf, die diesen Rezeptorkomplex exprimieren (Abbildung

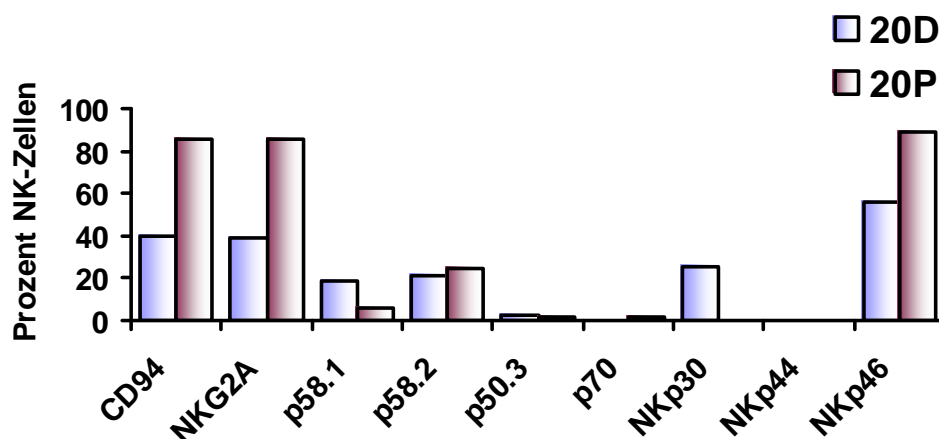
## E. ERGEBNISSE

E3.5). Das Verhältnis zwischen Patient und Spender liegt bei 5 zu 1 (CD94) und ca. 2 zu 1 für NKG2A. Gleichzeitig ist die Expression der inhibierenden KIR-Rezeptoren p58.1 (KIR2DL1) und p58.2 (KIR2DL2/3) im Patienten im Vergleich zum Spender stark vermindert (Verhältnis der Prozent KIR-positiver NK-Zellen Patient/Spender: p58.1: 0,22, p58.2: 0,28). Die KIRs KIR3DL1 (p70) und KIR2DS4 sind annähernd gleichstark auf den NK-Zellen des Patienten bzw. Spenders zu finden. Bei den aktivierenden NCRs NKp30, NKp44 und NKP46 zeigt sich im Fall von NKp30 ein Verhältnis von 0,53 (Patient/Spender).

Interessant ist die Tatsache, dass sich an Tag 185 nach Transplantation ca. 1% NKp44-positive NK-Zellen im Patienten finden lassen. In Bezug auf NKp46 lässt sich ein Verhältnis von 1,4 zu Gunsten des Patienten beobachten.



**Abbildung E3.5:** Prozent  $CD56^+CD3\varepsilon^-$ -NK-Zellen aus dem PBSC-Präparat des Spenders 19D und PBMC des Patienten 19P an Tag 185 nach Transplantation, die für die gezeigten Oberflächenproteine CD94, NKG2A, p58.1 (CD158a), p58.2 (CD158d), p50.3 (CD158i), p70 (CD158e1), NKp30, NKp44 und NKp46 positiv sind.



**Abbildung E3.6:** Prozent  $CD56^+CD3\varepsilon^-$ -NK-Zellen aus dem PBSC-Präparat des Spenders 20D und PBMC des Patienten 20P an Tag 193 nach Transplantation, die für die gezeigten Oberflächenproteine CD94, NKG2A, p58.1 (CD158a), p58.2 (CD158d), p50.3 (CD158i), p70 (CD158e1), NKp30, NKp44 und NKp46 positiv sind.

## E. ERGEBNISSE

---

Ähnlich wie im Fall des Patienten 19P lässt sich beim Patienten 20P an Tag 193 nach Transplantation ein stark erhöhter Anteil CD94/NKG2A positiver NK-Zellen im Vergleich zum Spender feststellen (2:1) (Abbildung E3.6, Seite 140). Der inhibierende KIR2DL1 (p58.1) wird im Vergleich zum Spender 20D nur auf wenigen NK-Zellen im Patienten gefunden (Verhältnis: 0,32), wohingegen KIR2DL2/3 (p58.2) quantitativ nahezu identisch im Patienten zu finden ist. Der aktivierende KIR2DS4 (p50.3) findet sich im Patienten wie Spender nur auf einer sehr geringen Zahl von NK-Zellen (Spender: 2,5%, Patient: 1,4% der NK-Zellen). P70 (KIR3DL1) findet sich nur im Patienten (ca. 2% der NK-Zellen).

Der normalerweise konstitutiv exprimierte NCR NKp30 findet sich nicht auf den NK-Zellen des Patienten nach Rekonstitution. Laut Literatur kann die Zahl der NKp30-positiven NK-Zellen 4-6 Monate nach haploidentischer Transplantation verringert sein (Nguyen, Dhedin et al. 2005). Wie auch im Fall des Patienten 19P zeigt sich eine im Vergleich zum Spender erhöhte Anzahl an NKp46-positiven NK-Zellen. NKp44 kann weder im Spender 20D, noch im Patienten an Tag 193 nach Transplantation nachgewiesen werden. Die stark erhöhte Expression von NKG2A und CD94 kann möglicherweise durch die schwache Expression der inhibierenden KIR erklärt werden, wodurch das Gleichgewicht der NK-Zellregulation wieder hergestellt werden kann.

Zusammengefasst lässt sich zeigen, dass bei allen Patienten eine Erholung der CD6-positiven NK-Population beobachtet werden kann, der Anteil an CD6-positiven NK-Zellen in den Patienten jedoch auch ca. 180 Tagen nach Transplantation im Vergleich zu den Spenderproben noch deutlich verringert ist. Dies ist möglicherweise immer noch Folge des CD6-Depletionseffekts des Transplantationsprotokolls. Daneben konnte ich zeigen, dass die Expression des inhibierenden Rezeptorkomplexes CD94/NKG2A einem von der Expression der inhibierenden KIR-Rezeptoren unterschiedlichen Muster folgt. So konnte zumindest in einem Fall nachgewiesen werden, dass der Prozentsatz NKG2A-positiver NK-Zellen dann verringert war, wenn gleichzeitig eine große Anzahl von NK-Zellen vorlag, die einen inhibierenden KIR exprimierten. Generell scheint die Anzahl der NK-Zellen mit Expression von CD94/NKG2A dann erhöht zu sein, wenn die inhibierenden KIR-Rezeptoren auf einem geringeren Prozentsatz der NK-Zellen exprimiert werden. Bei drei der vier untersuchten Patienten konnten NKp44-positive NK-Zellen nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Aktivierung und somit eine zugrunde liegenden Entzündung hinweisen könnte. Der normalerweise konstitutiv exprimierte NCR NKp30 konnte bei zwei Patienten (16P, 20P) nachgewiesen werden. Der konstitutiv exprimierte NCR NKp46 findet sich bei allen Spendern und Patienten, wobei der Anteil an NKp46-positiven NK-Zellen im Vergleich zum Spender bei drei Patienten erhöht war (17P, 19P, 20P).

### 4. Toleranzmodell der haploidentischen Transplantation

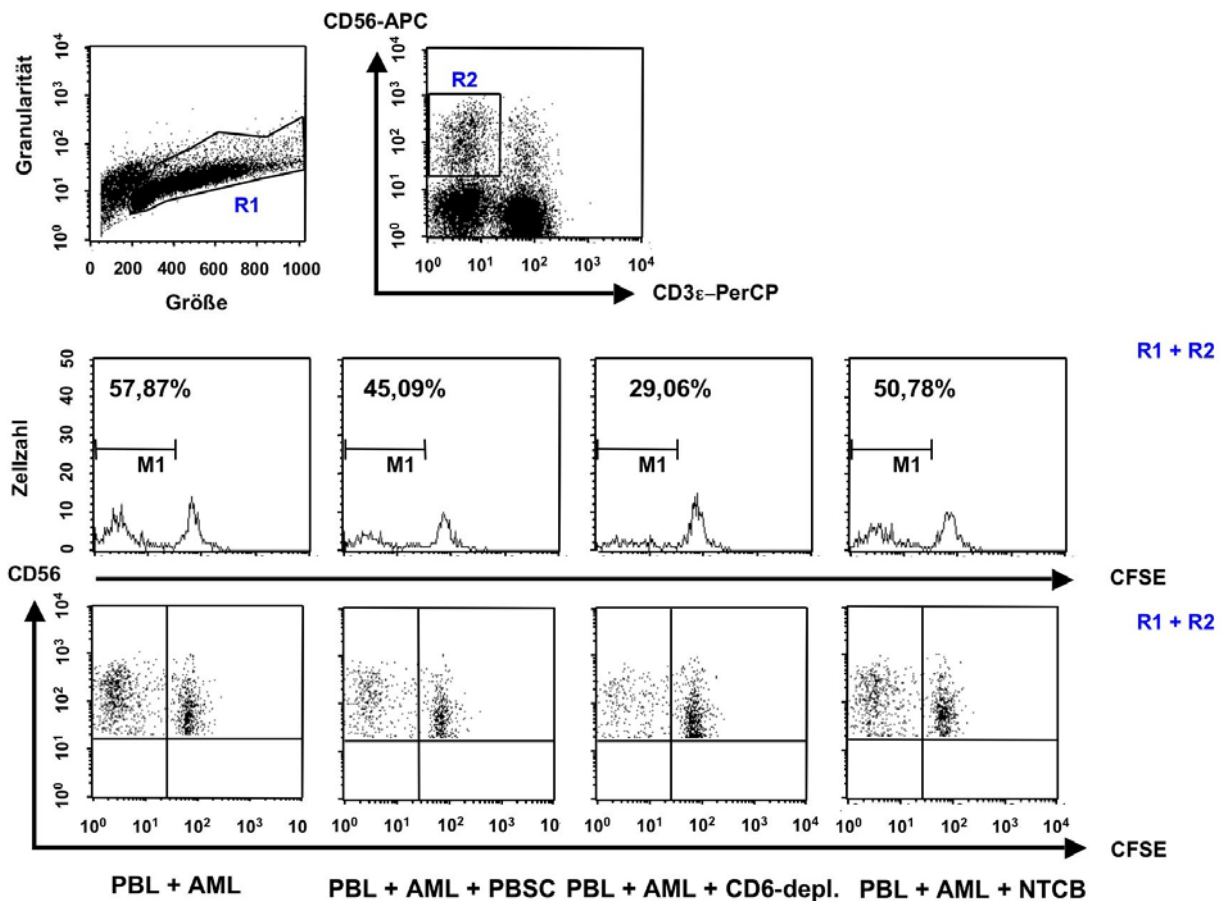
Bei der haploidentischen Stammzelltransplantation gemäß dem Protokoll von Prof.Dr. Hans-Jochem Kolb werden T-Zellen und eine Subpopulation an NK-Zellen mittels CD6-Depletion aus dem PBSC des Spenders vor Transplantation entfernt. Die Depletion CD6-positiver T-Zellen verhindert möglicherweise die Entwicklung einer GvHD, ohne die GvL (Graft-versus-Leukämie) Wirkung zu beeinträchtigen (Soiffer and Ritz 1993). Trotz der Tatsache, dass nach CD6-Depletion im Mittel immer noch  $7,7 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup>-T-Zellen pro Kilogramm Körpergewicht transplantiert werden, wird jedoch keine verstärkte GvHD oder eine HvG-Reaktion beobachtet (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Hans-Jochem Kolb). Man spricht von einer sogenannten Immuntoleranz. Die Immuntoleranz soll durch T-Supressorzellen (*faciliator cells*) im Transplantat vermittelt werden, die gleichzeitig die Graft-versus-Host-Reaktion mit beeinflussen. Bei den postulierten T-Supressorzellen handelt es sich um CD6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Hans-Jochem Kolb sowie Europäische Patentanmeldung EP1370641), (Schumm, Gunther et al. 1994; Kolb, Günther et al. 2006). Die immunsupprimierende Wirkung des CD6-depletierten PBSC wurde mittels gemischter Lymphozytenkultur (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) gezeigt (Schumm, Gunther et al. 1994). Dabei konnte die Suppression *in vitro* durch einen verringerten Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin in der gemischten Lymphozytenkultur in einem allogenen Ansatz nachgewiesen werden (EP1370641). Der Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin als Proliferationsmarker erlaubt jedoch nicht, die Proliferation einer spezifischen Population (Responderzellen) in der gemischten Lymphozytenkultur nachzuweisen, da der Gesamteinbau von radioaktivem Thymidin einer Mischung aus unterschiedlichen Zellarten (T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen usw.) gemessen wird. Aus dem Unterschied der Einbaurate für <sup>3</sup>H-Thymidin im Vergleich zu einem Ansatz ohne zugesetzte putativ suppressierende Zellen wird auf das Vorliegen einer Immunsuppression geschlossen. Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte ein experimentelles System erarbeitet werden, dass es erlaubt, die Proliferation der einzelnen Responder-Zellpopulationen (NK-Zellen, B-Zellen bzw. T-Zellen) auf Stimulus durch Zielzellen zu verfolgen, im Vergleich zu einem Ansatz, bei dem zugesetztes CD6-depletiertes PBSC (Effektorzellen) möglicherweise suppressiv auf die Proliferation der genannten Responderzellen wirkt. Vergleiche Methoden 9 für eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Für die gezeigten Versuche wurden als Responderzellen CFSE-markierte NTCB (30D) bzw. CFSE-markierte PBL (17D) eingesetzt. Als bestrahlte Zielzellen (80Gy) wurden PBL eines Normalspenders (WG) bzw. Leukämiezellen des zum Spender korrespondierenden Patienten (17P, AML) herangezogen. Die CFSE-gefärbten Responderzellen und bestrahlten Zielzellen (zur Unterdrückung der Proliferation der Zielzellen) wurden in einem Verhältnis von 1:1 zu je  $2 \times 10^6$ -Zellen alleine, oder zusammen

## E. ERGEBNISSE

mit  $2 \times 10^6$  Effektorzellen in einem Volumen von 2ml (Medium RPMI III, 10% HS) für 5 Tage in einer 24-Mulden-Platte kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit CD56-PE, CD3 $\epsilon$ -PerCP gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen. Gleichzeitig wurde eine Kontrolle der CFSE-gefärbten Responderzellen alleine (Proliferationskontrolle ohne Stimulus) mitgeführt.

Es wurden folgende Ansätze untersucht:

- CFSE-markierte Responderzellen ohne Stimulus,
- CFSE-markierte Responderzellen + bestrahlte Zielzellen (=Stimulus)
- CFSE-markierte Responderzellen + Effektorzellen + bestrahlte Zielzellen



**Abbildung E4.1:** Darstellung der Gating-Strategie und Auswertung des Toleranzversuchs. Es wurde im SSC-H, FSC-H auf lebende Zellen eingestellt (R1). Anschließend wurde auf CD56<sup>+</sup>CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>-NK-Zellen eingestellt (R2) und von diesen NK-Zellen (R1+R2) der Prozentsatz CFSE<sup>dim</sup>-NK-Zellen bestimmt. In den Histogrammen sind die Prozent CD56<sup>+</sup>CFSE<sup>dim</sup>-NK-Zellen aus CFSE-markierten PBL des Spenders 17D nach 5 Tagen Kokultivierung in folgenden Ansätzen gezeigt: A: PBL + AML (17P), B: PBL + AML + PBSC (17D), C: PBL + AML + CD6-depl. PBSC (17D) und D: PBL + AML + NTCB (17D).

## E. ERGEBNISSE

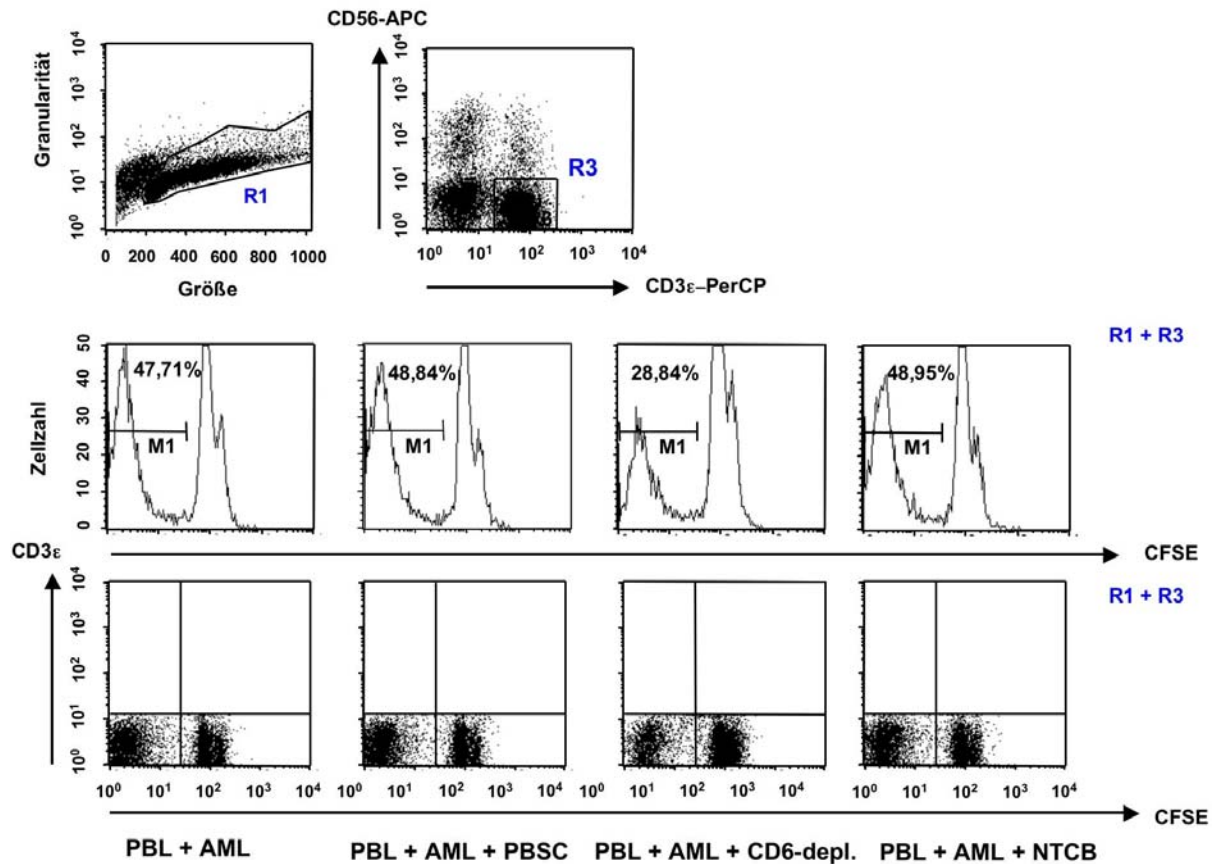
---

Abbildung E4.1 zeigt die FACS-Analyse des Toleranzversuchs. In der FACS-Analyse wurde auf lebende Lymphozyten (R1)  $CD56^+CD3\epsilon^-$ -NK-Zellen (R2) eingestellt und anschließend der Prozentsatz  $CFSE^{dim}$ -NK-Zellen bestimmt. Die Veränderung des Prozentsatzes von  $CFSE^{dim}$ -NK-Zellen ist anhand von Histogrammen und Dot-Plots für die Ansätze A:  $CFSE$ -markierte PBL des Spenders 17D + AML-Zellen des korrespondierenden Patienten 17P, B:  $CFSE$ -markierte PBL (17D) + AML (17P) + PBSC des Spenders 17D, C:  $CFSE$ -markierte PBL (17D) + AML (17P) +  $CD6$ -depletierte PBSC des Spenders 17D und D:  $CFSE$ -markierte PBL (17D) + AML (17P) + NTCB des Spenders 17D gezeigt. Beim Vergleich von Ansatz A (ohne Effektorzellen) mit B (PBSC als Effektorzellen) und C (mit  $CD6$ -depletierten PBSC als Effektorzellen) erkennt man eine Abnahme der proliferierenden NK-Zellen ( $CFSE^{dim}$ -NK-Zellen) um 12,8% (gerundet, Ansatz B) und 28,8% (gerundet, Ansatz C). D.h. man könnte von einer Suppression der Proliferation der  $CD56^+CD3\epsilon^-$ -NK-Zellen des Spenders durch PBSC bzw.  $CD6$ -depletierte PBSC sprechen.

Betrachtet man das Proliferationsverhalten von T-Zellen ( $CD56^-CD3\epsilon^+$ , R1 und R3) im PBL des Spenders nach Stimulation mit AML-Zellen des haploidenten Empfängers 17P, so erkennt man interessanterweise wie im Fall der NK-Zellen (Abbildung E4.1) eine Verringerung des Prozentsatzes  $CFSE^{dim}$ -T-Zellen im Ansatz C (Kokultivierung mit den Effektorzellen  $CD6$ -depletiertes PBSC) (Abb. E4.2, Seite 145), nicht jedoch in den Ansätzen B und D. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise eine Anreicherung der „Suppressorzellen“ im  $CD6$ -depl. Präparat stattfindet.



## E. ERGEBNISSE



**Abbildung E4.2:** Darstellung der Gating-Strategie und Auswertung des Toleranzversuchs. Es wurde auf lebende Zellen eingestellt (R1). Anschließend wurde auf CD56<sup>-</sup>CD3ε<sup>+</sup>-T-Zellen eingestellt (R3) und von diesen T-Zellen (R1+R3) der Prozentsatz CFSE<sup>dim</sup>-T-Zellen bestimmt. In den Histogrammen sind die Prozent CD56<sup>-</sup> CD3ε<sup>+</sup>-CFSE<sup>dim</sup>-T-Zellen aus CFSE-markierten PBL des Spenders 17D nach 5 Tagen Kokultivierung in folgenden Ansätzen gezeigt: A: PBL + AML (17P), B: PBL + AML + PBSC (17D), C: PBL + AML + CD6-depl. PBSC (17D) und D: PBL + AML + NTCB (17D).

Bei vier weiteren Toleranzversuchen konnte nur bei einem Teil der Experimente eine Verringerung der Proliferation von NK- und T-Zellen nach Zusatz von CD6-depletiertem PBSC im Vergleich zur Proliferation von PBL bzw. NTCB nach Stimulation mit Zielzellen beobachtet werden. Parallel zu einem Toleranzversuch wurde mit identischen Ansätzen der Einfluss von PBSC bzw. CD6-depletiertem PBSC auf die Proliferation mittels <sup>3</sup>H-Thymidineinbau untersucht (MLR). Die einzelnen Ansätze wurden als Quadruplikate mitgeführt und aus den Zerfallsereignissen pro Minute (CpM, *counts per minute*) der Mittelwert gebildet. Weist man dem Mittelwert der Zerfallsereignisse von unstimuliertem NTCB (1654,75) den Wert 1 zu (Stimulationsindex = 1) und berechnet das Vielfache der Zunahme an Zerfallsereignissen (entspricht dem Einbau von radioaktivem <sup>3</sup>H-Thymidin) in Bezug auf den Stimulationsansatz (NTCB + irr. PBL) sowie in Bezug auf die Ansätze NTCB + irr. PBL + PBSC und NTCB + irr. PBL + CD6-depl. PBSC, so erkennt man eine Zunahme

## E. ERGEBNISSE

des Thymidineinbaus in NTCB des Spenders 30D nach Stimulation mit allogenen bestrahlten PBL (WG) um das 7,2-fache und eine Zunahme um das 5,2-fache im Fall von NTCB + irr. PBL + PBSC bzw. CD6-depletiertem PBSC (Tabelle T4.1).

	MW (CpM)	SI
unstim.NTCB	1654,75	1
NTCB + irr. PBL	11842,75	7,2
NTCB + irr. PBL + PBSC	8647,25	5,2
NTCB + irr. PBL + CD6-depl.	8658	5,2

**Tabelle T4.1:** Stimulationsindex (SI) für stimulierte NTCB des Spenders 30D und stimulierte NTCB nach Zusatz von PBSC oder CD6-depletiertem PBSC.

Durch die Zugabe von PBSC bzw. CD6-depletiertem PBSC kommt es also zu einem Rückgang des Stimulationsindex im Vergleich zum Ansatz der allogenen Stimulation von NTCB durch bestrahlte PBL. Dies lässt möglicherweise auf eine Suppression der Proliferation der im NTCB vorhandenen alloreaktiven T-Zellen durch Zellen im PBSC bzw. CD6-depletiertem PBSC schließen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in zwei von 6 Versuchen eine Suppression der Proliferation stimulierter Responderzellen (NTCB oder PBL) durch PBSC bzw. CD6-depletierte PBSC nachgewiesen werden konnte. Bei einem Versuch, bei dem die Proliferation mittels  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau nachgewiesen wurde, konnte eine potentielle Suppression der Proliferation von Zellen im PBSC und CD6-depletierten PBSC ansatzweise gezeigt werden. Der Nachweis der postulierten suppressiven Wirkung einer  $\text{CD8}^+$ -T-Zellsuppressorpopulation in den Präparate konnte durch vorliegende Arbeit nicht abschließend erbracht werden. Die Hinweise aus meinen Vorversuchen ermutigen zu weiteren Analysen bezüglich der suppressiven Wirkung der Präparate nach CD6-Depletion.

### F. DISKUSSION

#### 1. Charakterisierung der individuellen funktionellen Unterschiede verschiedener NK-Linien

Natürliche Killerzellen, die durch einen  $CD56^+CD3\epsilon^-$  Phänotyp gekennzeichnet sind, gehören zur Gruppe der Lymphozyten und spielen bei der sogenannten angeborenen Immunität gegenüber entarteten oder mit bestimmten Viren oder Bakterien infizierten Zellen eine herausragende Rolle (Biron, Nguyen et al. 1999). Die Expression einer Vielzahl unterschiedlicher NK-Rezeptoren, die aktivierend oder inhibierend auf die Funktion der Zellen wirken, erlaubt es den Natürlichen Killerzellen zwischen entarteten bzw. infizierten Zellen und gesunden Zellen zu differenzieren. Im Gegensatz zu T-Lymphozyten, die über einen T-Zell-Rezeptor Antigene auf Zielzellen erkennen, wird der Aktivierungszustand der NK-Zellen durch ein dynamisches Gleichgewicht der inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren bestimmt. Die durch die aktivierenden Rezeptoren vermittelten Signale werden über Signalkaskaden weitergeleitet und führen letztlich zu einer Aktivierung spezifischer Gene, die anschließend die Funktion der NK-Zellen in Richtung einer zytotoxischen Aktivität oder Sezernierung bestimmter Zytokine bzw. Chemokine lenkt, die wiederum Einfluss auf Zellen des adaptiven Immunsystems haben (Kobayashi, Fitz et al. 1989; Scharon and Scott 1993; Carson, Ross et al. 1995; Unanue 1997; Fehniger, Shah et al. 1999). Die Stimulation inhibierender Rezeptoren antagonisiert durch negative Signale diese Aktivierungskaskade. Nur eine gleichzeitige Betrachtung von Aktivierung und Inhibition über NK-Rezeptoren kann Aufschluss über die Abläufe bei der Aktivierung und Funktion von NK-Zellen im Organismus geben. Die aktivierenden bzw. inhibierenden NK-Zellrezeptoren erkennen die Veränderung der Menge an exprimierten MHC-Klasse-I-Molekülen auf den Zielzellen, wobei eine verringerte oder fehlende MHC-Klasse-I-Expression auf entarteten bzw. infizierten Zellen oder Zellen, die zellulärem Stress ausgesetzt sind, zu einer Verschiebung des dynamischen Gleichgewichts in Richtung einer Aktivierung der NK-Zellen führt (Karre, Ljunggren et al. 1986; Lopez-Botet and Bellon 1999; Karre 2002). Dieses als „missing self-recognition“ bekannte Prinzip erklärt die Anfälligkeit MHC-Klasse-I-negativer Zielzellen gegenüber einer Lyse durch NK-Zellen, jedoch müssen neben der ausbleibenden Stimulation inhibierender Rezeptoren auch aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen induziert werden, um zu einer Aktivierung der NK-Zellen zu führen. Bei infizierten bzw. entarteten Zellen findet man häufig eine gesteigerte Expression von Liganden für aktivierende NK-Rezeptoren (Raulet 2003; Moretta and Moretta 2004). Weiterhin kann ein durch die gesteigerte Expression von Liganden für aktivierende NK-Rezeptoren starkes stimulatorisches Signal das durch die Bindung von MHC-Klasse-I-Molekülen an inhibierende Rezeptoren auf NK-Zellen bedingte

inhibitorische Signal überschreiben (Correa, Corral et al. 1994; Cosman, Mullberg et al. 2001; Sutherland, Chalupny et al. 2001).

### 1.1 Der aktivierende Rezeptor NKG2D und sein Ligand ULBP4

Im Zuge dieser Arbeit konnte ich den Einfluss der Expression eines Liganden für einen aktivierenden NK-Zellrezeptor auf MHC-Klasse-I-negativen Zielzellen zeigen. Die UL16-Bindeproteine (ULBPs) stellen eine Familie von MHC-Klasse-I-verwandten Liganden des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen dar. So ist bekannt, dass die zur Familie der nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle gehörenden UL-16-Bindeproteine und die MHC-Klasse-I-verwandten Kettenmoleküle (MIC) ein stimulatorisches Signal in NK-Zellen induzieren, welches ein inhibierendes Signal, das über die Bindung von Liganden an inhibierende NK-Rezeptoren für MHC-Klasse-I-Moleküle vermittelt wird, überschreiben kann (Bauer, Groh et al. 1999; Cosman, Mullberg et al. 2001). UL-16 ist ein Glykoprotein aus dem humanen Zytomegalie-Virus HCMV, das Proteine kodiert, die in infizierten Zellen die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen herabregulieren (Sutherland, Chalupny et al. 2001).

Das oben genannte stimulatorische Signal wird durch Bindung der auf Chromosom 6q25 im Menschen kodierten ULBP-Moleküle (ULBP1-4) oder MIC-Moleküle (kodiert auf Chromosom 6p21, MICA und MICB) an den NKG2D/DAP10-Rezeptorkomplex vermittelt, der auch von T-Zellen exprimiert wird (Bauer, Groh et al. 1999; Diefenbach, Jamieson et al. 2000). Die Bindung und Wirkung der ULBPs konnte durch Blockierung von NKG2D mit monoklonalen anti-NKG2D-Antikörpern von Sutherland et al. gezeigt werden, wobei auch festgestellt wurde, dass MIC-Moleküle um die Bindung an NKG2D mit den ULBPs konkurrieren. Bekannt ist, dass ULBP-Moleküle zu einer gesteigerten Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen führen (Kubin, Cassiano et al. 2001) und dass die Expression von ULBPs auf MHC-Klasse-I-positiven Daudi-Zielzellen zur zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen gegenüber diesen Zellen führt, die normalerweise einer Lyse durch NK-Zellen entgehen. Darüber hinaus scheinen ULBP-Moleküle ein starkes Aktivierungspotential von NK-Zellen zu besitzen, da eine sehr viel geringere Expression von ULBP-Molekülen auf Zielzellen, im Vergleich zur Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf diesen Zellen zu einer Aktivierung von NK-Zellen führt (Cosman, Mullberg et al. 2001). Das legt den Schluss nahe, dass NK-Zellen nicht nur MHC-Klasse-I-defiziente Zielzellen, wie Tumorzellen oder infizierte Zellen zu lysieren vermögen, sondern auch Zellen, deren MHC-Klasse-I-Expression unverändert ist, die jedoch eine gesteigerte Expression von ULBP- und MIC-Molekülen aufweisen.

### **1.1.1 Klonierung von ULBP4 und Erzeugung stabiler K-562-Transfektanten mit ULBP4-Expression**

Für die Untersuchung der Wirkung von ULBP4 auf den aktivierenden Rezeptor NKG2D bei verschiedenen NK-Zelllinien (NKL, NK92 und B.3NK) und die Erzeugung eines monoklonalen Antikörpers gegen ULBP4 wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit MHC-Klasse-I-negative K-562-Zellen und murine P815-Zellen mit einem Vektorkonstrukt zur Expression von humanem ULBP4 transfiziert. Die Expression von ULBP4 auf den genannten Zellen konnte mittels Tetramerfärbung und Umschreiben von mRNA in cDNA mit anschließender PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen werden.

### **1.1.2 Erzeugung eines monoklonalen Antikörpers gegen ULBP4**

Mit den erzeugten P815-ULBP4-Transfektanten sollte mittels intraperitonealer und subkutaner Injektion von Zelltrümmern der transfizierten murinen Zellen zusammen mit inkomplettem Freudschen Adjuvans in zwei Long-Evans-Ratten ein monoklonaler Antikörper erzeugt werden. Der Test auf mögliche spezifische Antikörperkandidaten sollte anschließend mit den erzeugten K-562-ULBP4-Transfektanten durchgeführt werden. Aufgrund einer starken Kreuzspezifität der acht reklonierten und getesteten Antikörperkandidaten gegenüber anderen ULBP4-negativen K-562-Transfektanten konnte letztlich kein monoklonaler Antikörper gegen ULBP4 isoliert werden. Die Gründe für die Kreuzspezifität der Antikörperkandidaten sind unklar. Die Erzeugung monoklonaler Antikörper mittels Zelltrümmern, die eine gesteigerte Oberflächenexpression des gewünschten Antigens zeigen, ist abhängig von der Dichte der Expression und der richtigen und vollständigen Faltung des Antigens. Es muss also sichergestellt sein, dass das Antigen nativ gefaltet ist, damit das Immunsystem der Ratte Antikörper gegen Epitope erzeugt, die so auch auf dem nativen Oberflächenmolekül zu finden sind, gegen das der monoklonale Antikörper erzeugt werden soll. Die Arbeitsgruppe Dr. Kremmer (Service-Einheit Monoklonale Antikörper GSF-mAb, GSF Großhadern), mit deren Zusammenarbeit der Antikörper gegen ULBP4 erzeugt werden sollte, ist mittlerweile dazu übergegangen bei der Immunisierung anstelle von Zelltrümmern theoretisch bestimmte und artifiziell erzeugte Peptide des gewünschten Antigens zu verwenden (persönliche Mitteilung Dr. med. Elisabeth Kremmer, GSF Großhadern). Eine weitere Erklärung für die Kreuzspezifität der acht Antikörperkandidaten liegt in der Homologie der Aminosäuresequenz von ULBP4 und den anderen ULBP-Molekülen 1-3. So ist die Aminosäuresequenz von ULBP4 zu ca. 35% identisch mit ULBP1 und zu ca. 28% identisch zu der von ULBP2 und zu ca. 33% identisch zu der von ULBP3.

Insbesondere liegt eine Homologie von ULBP4 zu den  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen von ULBP1, ULBP2 und ULBP3 vor. Die  $\alpha$ 1-Domäne von ULBP4, Leu<sup>24</sup>-His<sup>31</sup> bis Asp<sup>16</sup> stimmt mit der  $\alpha$ 1-Domäne von ULBP1, ULBP2 und ULBP3 überein. Die  $\alpha$ 2-Domäne von ULBP4 erstreckt sich von Aminosäurerest Pro<sup>117</sup> bis Thr<sup>207</sup>, was mit der  $\alpha$ 2-Domäne von ULBP1 bis ULBP3 übereinstimmt. Daneben liegen hochkonservierte Aminosäurereste in den  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen von ULBP4 vor. Diese Homologie lässt sich durch das Übereinanderlegen der Aminosäuresequenzen von ULBP1 – ULBP4 nachweisen. Aufgrund der großen Homologie können die mittels Zelltrümmern von ULBP4-transfizierten P815-Zellen in Ratten generierten Antikörper möglicherweise Antigene auf K-562-Zellen erkennen, die ULBP1 und ULBP2 exprimieren. Die Auswahl ULBP4-spezifischer Peptide als Antigene sollte somit einen viel versprechenden Ansatz zur Erzeugung von Antikörpern gegen ULBP4 darstellen. Gegen ULBP4 gibt es mittlerweile jedoch käufliche monoklonale Antikörper, so dass eine Erzeugung nicht zwingend ist. Daneben wurde von Cosman et al. am 04.10.2002 eine US-Patentanmeldung (Cosman; David J. 2007) umfassend ULBP4-Protein sowie einen Antikörper gegen ULBP4 und den therapeutischen Einsatz von ULBP4-Peptiden im Zuge einer Immunerkrankung oder Krebserkrankung beim US-Patentamt eingereicht.

### **1.1.3 Untersuchung des Effekts der ULBP4-Transfektanten auf die Funktion verschiedener NK-Zelllinien**

#### **1.1.3.1 Phänotyp verschiedener NK-Zelllinien**

Aufgrund der Untersuchung der Oberflächenexpression der wichtigsten NK-Rezeptoren konnte ich zeigen, dass jede der etablierten NK-Linien (NKL, YT und NK92) und die allogene NK-Linie B.3NK ein individuelles Muster an Rezeptoren aufweist. Die Zelllinie YT zeigte dabei ein im Vergleich zu den anderen Linien ein eingeschränktes Repertoire an Rezeptoren, die allogene NK-Linie B.3NK dagegen ein breites Spektrum an exprimierten Rezeptoren und als einzige untersuchte Linie die Expression von zumindest zwei KIR-Rezeptoren. Der Rezeptor NKG2D wurde bei der NKL in höchster Dichte auf der Zelloberfläche detektiert. Die Expression unterschiedlicher aktivierender Rezeptoren auf den verschiedenen NK-Linien kann eine Erklärung für das unterschiedliche zytotoxische Verhalten der genannten Linien gegenüber Zielzellen geben.

### 1.1.3.2 Zytotoxizität verschiedener NK-Zelllinien gegenüber K-562-ULBP4-Transfektanten

Mit den im Zuge dieser Arbeit erzeugten K-562-ULBP4-Transfektanten wurden in einem Chromfreisetzungsversuch drei humane NK-Zelllinien (NKL, NK92 und B.3NK) stimuliert. Die drei NK-Linien wurden zuvor, zusammen mit der Zelllinie YT auf die Expression verschiedener NK-Rezeptoren per FACS-Analyse untersucht. Im Fall der NKL-Zelllinie konnte eine gesteigerte Lyse von ULBP4-exprimierenden K-562-Zellen im Vergleich zu Wildtyp K-562-Zellen gezeigt werden. Im Fall der NK92-Zelllinie und der allogenen B.3NK-Zelllinie konnte dieser Effekt jedoch nicht nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Expression von NKG2D auf den drei genannten NK-Zelllinien zeigte sich, dass die NKL im Vergleich zur NK92 und B.3NK eine erhöhte Dichte an NKG2D-Rezeptormolekülen aufweist. Dieser Unterschied in der Expressionsdichte des aktivierenden Rezeptors kann eine Erklärung für die gesteigerte Zytotoxizität der NKL gegenüber ULBP4-exprimierenden K-562 im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten NK-Linien sein. Eine weitere Erklärung für die geringere Induzierbarkeit der zytotoxischen Aktivität bei NK92 und B.3NK nach Stimulation von NKG2D auf diesen Zellen mit ULBP4 exprimierenden K-562-Zellen könnte in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen der drei untersuchten Zelllinien zu finden sein. Die ULBP-Moleküle induzieren vielfältige Signalkaskaden in NK-Zellen nach Bindung an den NKG2D/DAP10-Rezeptorkomplex. So wird die Serin-/Threonin-Kinase Akt über einen PI-3-Kinase abhängigen Signalweg aktiviert. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (*second-messenger*) und der Phosphorylierung von Tyrosinresten verschiedener Proteine. Darüber hinaus werden durch ULBP-Moleküle die Janus-Kinase (JAK), STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) und MAP-Kinasen, ERK1/2 aktiviert (Sutherland, Chalupny et al. 2002). Die Signaltransduktion in den genannten NK-Zelllinien und einer T-Zelllinie wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Multiplex-Verfahren und Western-Blot untersucht und die Ergebnisse werden weiter unten diskutiert.

Die Zelllinie NKL wurde in einem weiteren Experiment in Bezug auf die Wirkung der Bindung von ULBP4 an NKG2D untersucht. Dazu wurde ein klassisches Antikörper-Blockierungsexperiment durchgeführt, bei dem mittels monoklonaler Antikörper gegen die auf K-562-Zellen exprimierten ULBP-Moleküle 1-3 und MICA die Bindung dieser NKG2D-Liganden an den Rezeptor auf NKL-Zellen unterbunden wurde. Neben den K-562-Wildtypzellen wurden die K-562-ULBP4-Transfektanten als Zielzellen eingesetzt. Es ließ sich eine generell gesteigerte Lyse der ULBP4-Transfektante von K-562 im Vergleich zum

Wildtyp dieser Zielzelle zeigen. Die Blockierung von ULBP1 und ULBP2 auf den Zielzellen mit Antikörpern gegen diese NKG2D-Liganden führt zu einer Verringerung der spezifischen Lyse durch NKL, die konzentrationsabhängig (Konzentration des Blockierungsantikörpers) ist. Allerdings ist die spezifische Lyse der ULBP4-Transfektante im Vergleich zur Wildtyp-K-562 immer noch gesteigert. Dies spricht dafür, dass für die Aktivierung der Zytotoxizität der NKL die Bindung unterschiedlicher ULBP-Moleküle notwendig ist, wobei die Bindung eines ULBP-Moleküls an NKG2D für die Lyse hinreichend ist. So könnte man davon ausgehen, dass es durch die gleichzeitige Bindung von ULBP1, ULBP2 und ULBP4 an jeweils getrennte NKG2D-Rezeptoren auf den NK-Zellen zu einer eindeutigen Aktivierung kommt. Noch wichtiger scheint jedoch die Bindung von MICA zu sein, da eine Blockierung mit anti-MICA-Antikörper zu einer starken Abnahme der spezifischen Lyse führt. Interessant ist, dass die spezifische Lyse bei Blockierung von MICA im Fall der ULBP4-Transfektante die zytotoxische Aktivität der NKL nahezu vollständig abschaltet. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Bindung von MICA an NKG2D eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung der NKL durch ULBP-Moleküle ist. Bekannt ist, dass MICA die Zytotoxizität von NK-Zellen als Antwort auf epitheliale Tumoren induziert (Menier, Riteau et al. 2002). Hanaoka et al. haben in einem ähnlichen Blockierungsexperiment nachgewiesen, dass die Blockierung von MICA/B auf K-562-Zellen mittels polyklonaler Antikörper zu einer Verringerung der Lyse durch die KHYG-1 NK-Zelllinie führt (Hanaoka, Kawaguchi et al. 2006). Weiter wurden durch die genannte Arbeit, die zeitlich nach den von mir durchgeführten Experimenten veröffentlicht wurde, die von mir gefundenen Ergebnisse bestätigt. So konnten Hanaoka et al. zeigen, dass bei GPI-defizienten (Glykophosphoinositol, GPI) K-562-Zellen (erzeugt durch *PIGA*-Mutationen), die durch das Fehlen von GPI keine GPI-verknüpften ULBP-Moleküle an der Oberfläche exprimieren können, eine verringerte Lyse durch NK-Zellen zu beobachten ist. Diese verringerte Lyse konnte auch bei GPI-positiven K-562-Zellen nach Blockierung von ULBP1 und ULBP2 mittels Antikörpern in einer konzentrationsabhängigen Weise beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression von ULBP4 auf normalerweise ULBP4-negativen Zellen über die Aktivierung des NKG2D-Rezeptors zu einer gesteigerten Lyse durch NKL-Zellen führt. Die ULBP-Moleküle wirken scheinbar synergistisch bei der Aktivierung von NK-Zellen. Es ist davon auszugehen, dass infizierte bzw. Zellen unter Stressbedingungen die ULBP-Moleküle 1-4 sowie die MIC-Moleküle MICA und MICB verstärkt auf der Zelloberfläche exprimieren und NK-Zellen die Dichte der genannten Liganden durch den Rezeptor NKG2D erkennen und so aktiviert werden. So liegt die Hypothese nahe, dass die Aktivierung von NK-Zellen über die gleichzeitige Bindung verschiedener Liganden für NKG2D an jeweils getrennte NKG2D-Rezeptoren erfolgreich induziert wird. Die Bindung eines Liganden allein führt gemäß dieser Hypothese noch nicht zu einer starken Aktivierung. Gleichzeitig werden mögliche inhibitorische Signale über



inhibierende Rezeptoren auf den NK-Zellen erkannt und nur, wenn das aktivierende Signal überwiegt, kommt es zu einer zytotoxischen Aktivität.

### **1.2 Sezernierung von Zytokinen nach Stimulation aktivierender Rezeptoren auf NK-Zelllinien**

Es ist bekannt, dass die Bindung von ULBPs an den aktivierenden NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen zur Sezernierung verschiedener Zytokine und Chemokine wie IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  führt (Cosman, Mullberg et al. 2001; Sutherland, Chalupny et al. 2001). Im Zuge meiner Arbeit habe ich die Wirkung der Induktion mittels monoklonaler Antikörper gegen verschiedene aktivierende NK-Rezeptoren wie NKG2D, 2B4 (CD244), NKp30, NKp44 und NKp46 auf den NK-Zelllinien NKL, YT, NK92 und B.3NK untersucht. Mit Hilfe der Multiplex-Technologie konnte die Freisetzung mehrere Zytokine/Chemokine nach Induktion gleichzeitig bestimmt werden. Dabei wurde die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie MIP-1 $\beta$  und GM-CSF untersucht. Bei der Zelllinie NKL führt die Stimulation mit Antikörpern gegen NKG2D im Vergleich zur Stimulation mit anti-CD2-Antikörper zu einer gesteigerten Freisetzung von IFN- $\gamma$ , MIP1- $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ; IL-10 und IL-6 werden nur in geringen Mengen im Bereich des Hintergrunds sezerniert. Die NKL besitzt also ein „klassisches“, induzierbares NK-Zytokin- bzw. Chemokinfreisetzungsmuster. Ein ähnliches Bild ergab sich bei Stimulation von NKL-Zellen mit anti-CD244-Antikörper. Die aus einem Allo-Stimulationsansatz gewonnenen B3.NK Zellen zeigen im Gegensatz zu den anderen untersuchten NK-Linien eine konstitutive Sekretion von IL-5 und IL-13 sowie eine nur leicht gesteigerte Freisetzung von TNF- $\alpha$  (< 50pg/ml) und GM-CSF nach Induktion über NKG2D. MIP-1 $\beta$  wird von B.3NK-Zellen nach Stimulation über NKG2D und 2B4 vermehrt freigesetzt. B.3NK-Zellen zeigen also ein eher für TH<sub>2</sub>-T-Zellen typisches Zytokinfreisetzungsmuster mit IL-5 und IL-13. Im Vergleich dazu besitzen die Zelllinien YT und NK92 ein eingeschränktes Zytokinrepertoire nach Stimulation über NKG2D oder 2B4. Auffällig ist die konstitutive Sezernierung von IL-10 durch YT. Die Stimulation durch 2B4 löst im Fall der YT eine leicht erhöhte Freisetzung von MIP-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  aus. Die gesteigerte Sezernierung von IFN- $\gamma$  deckt sich mit den Beobachtungen von Chuang et al. (Chuang, Kim et al. 2000). Die Linie NK92 sezerniert stark MIP-1 $\beta$ , wobei sich die Freisetzung nach Stimulation über 2B4 noch signifikant steigern lässt. Die Stimulation über NKG2D führt bei der NK92 interessanterweise zu einer verringerten Sezernierung von MIP-1 $\beta$  im Vergleich zur Kontrolle bzw. Stimulation über 2B4. NK92 exprimiert den Rezeptor NKG2D, daher sollte eine Stimulierung dieses aktivierenden Rezeptors eher zu einer gesteigerten Freisetzung des Zytokins führen. Watzl et al. konnten bei Stimulation von NK92-C1-Zellen über NKG2D

zumindest eine gesteigerte Sekretion von IFN- $\gamma$  beobachten (Flaig, Stark et al. 2004). Bei dem von mir beobachteten Rückgang der Sekretion von MIP-1 $\beta$  handelt es sich möglicherweise um ein meßbedingtes Artefakt.

Generell scheint eine Stimulation über 2B4, im Vergleich zur Kontrolle bzw. Stimulation mit NKG2D bei allen untersuchten Zelllinien zu einer geringfügig stärkeren Freisetzung von Zytokinen zu führen. Die verschiedenen NK-Zelllinien weisen in Bezug auf die Zytokinfreisetzung nach Stimulation von NKG2D bzw. 2B4 eine große Plastizität auf.

In einem weiteren Versuch wurde die Zytokinfreisetzung verschiedener NK-Zelllinien nach Stimulation der Natürlichen-Zytotoxizitätsrezeptoren (NCRs) NKp30 (CD337), NKp44 (CD336) und NKp46 (CD335) untersucht, die keine Homologie zueinander oder zu anderen humanen Molekülen besitzen (Moretta, Biassoni et al. 2000; Moretta, Bottino et al. 2001). Die NCR-Rezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46 gelten als spezifische NK-Marker, da bisher auf keiner anderen hämatopoetischen Zellart die Expression dieser Marker nachgewiesen werden konnte. Die Blockierung dieser Rezeptoren führt zu einer Inhibierung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen *in vitro* (Pessino, Sivori et al. 1998; Cantoni, Bottino et al. 1999; Pende, Parolini et al. 1999; Sivori, Parolini et al. 2000). Die natürlichen Liganden für die NCRs sind jedoch weiterhin unbekannt (Warren, Jones et al. 2005), wobei neuere Erkenntnisse zumindest für NKp44 und NKp46 viral kodierte Hämagglutinine als Liganden nahe legen (Westgaard, Berg et al. 2004) und eine Bindung von NKp30 an das Protein pp65 des humanen Zytomegalie-Virus HCMV nachgewiesen wurde (Mandelboim, Lieberman et al. 2001; Arnon, Achdout et al. 2004; Arnon, Achdout et al. 2005). Darüber hinaus wurde kürzlich das HLA-B-assoziierte Transkript 3 (BAT3) als Ligand für NKp30 identifiziert, dass direkt an NKp30 bindet und die Zytotoxizität und Zytokinfreisetzung bei NK-Zellen stimuliert (von Strandmann, Simhadri et al. 2006). Ein neuartiger Ligand für NKp44 wird nach Infektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit HIV in Form eines HIV-1 Hüllproteins gp41 exprimiert (Vieillard, Strominger et al. 2005). Die NCRs spielen bei der NK-Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen eine herausragende Rolle, wie durch Rezeptorblockierungsexperimente gezeigt werden konnte (Moretta, Bottino et al. 2001), wobei die Dichte der Oberflächenexpression der NCRs direkt mit der Stärke der zytotoxischen Aktivität korreliert (Sivori, Parolini et al. 2000).

Bei den untersuchten NK-Zelllinien konnte ich im Fall der NKL eine gesteigerte Freisetzung von MIP-1 $\beta$ , IL-8 und IFN- $\gamma$  nach Stimulation des NCRs NKp46 zeigen. Bei der Zelllinie YT konnte keine Veränderung der Freisetzung der untersuchten Zytokine/Chemokine bei Stimulation über die NCRs beobachtet werden. Bei der NK92 führt die Stimulation über die NCRs im Vergleich zur Kontrolle interessanterweise zu einem Rückgang der Menge an sezernierten Zytokinen bzw. Chemokinen. Nur im Fall von IFN- $\gamma$  führt eine Induktion über

NKp30 zu einer leichten Steigerung der Sekretion. Wie oben beschrieben, führt die Stimulation über NKG2D im Fall von MIP-1 $\beta$  zu einem Rückgang der Menge an sezerniertem Chemokin. Zusammen mit der Beobachtung eines Rückgangs der Menge an freigesetzten Zytokinen und Chemokinen im Fall der Stimulation über die NCRs stellt sich die Frage, ob die Linie NK92 grundsätzlich nach Stimulation der aktivierenden Rezeptoren weniger Zytokine sezerniert, als ohne Stimulation. Diese Hypothese steht jedoch im Widerstreit zur Literatur. Im Fall der B.3NK hatte die Stimulation von NKp30 einen Einfluss auf die Freisetzung von MIP-1 $\beta$ . Alle vier untersuchten NK-Zelllinien zeigen somit ein voneinander abweichendes Freisetzungsmuster an Zytokinen und Chemokinen nach Induktion durch die NCRs NKp30, NKp44 und NKp46. Durch eine FACS-Analyse der genannten NK-Linie konnte die Expression der NCRs auf allen NK-Zelllinien nachgewiesen werden, wobei die Zelllinie YT NKp46 und die NK92-Zelllinie NKp30 nur in geringer Dichte exprimierten. Die Expression von NKp44, die normalerweise nur nach Induktion mit IL-2 auf NK-Zellen zu beobachten ist, erklärt sich bei den Zelllinien NKL, NK92 und den B.3NK-Zellen durch die Stimulation mit IL-2 in den NK-Zellmedien. YT scheint konstitutiv NKp44 zu exprimieren. Bekannt ist jedoch, dass NK-Zellen, die einen NKp46<sup>dim</sup>-Phänotyp besitzen geringe Mengen an NKp44 exprimieren (Sivori, Pende et al. 1999). Durch die oben diskutierte phänotypische Untersuchung der verschiedenen NK-Zelllinien mittels FACS-Analyse im Zuge dieser Arbeit konnte ich bei der YT-Zelllinie einen NKp46<sup>dim</sup>-Phänotyp nachweisen, bei gleichzeitiger Expression geringer Mengen von NKp44.

Die unterschiedlichen Zytokin- bzw. Chemokinsekretionsmuster der untersuchten NK-Zelllinien können möglicherweise auch durch Unterschiede in der Signaltransduktion der Zelllinien zu finden sein. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene NK-Zelllinien auf ihre Signaltransduktion nach Induktion mit PMA und Ionomycin mittels Multiplex-Verfahren untersucht.

### **1.3 Signaltransduktion in NK-Zellen nach Stimulation mit PMA-Ionomycin und Vergleich mit einer T-Zelllinie**

Die Aktivierung von NK-Zellen folgt nach Stimulus durch eine Zielzelle einem dynamischen Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalwegen. Die aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen können nach Induktion eine zytotoxische Aktivität oder Freisetzung von Zytokinen bzw. Chemokinen auslösen, wobei durch die Sezernierung von Zytokinen oder Chemokinen eine Wechselwirkung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem (T-Zellen, B-Zellen usw.) ausgelöst wird. Einige der aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen lösen eine Signalkaskade über Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) durch nicht-kovalente Bindungen an Transmembran-Signaladaptermoleküle aus, die

wiederum mit sogenannten Immunrezeptor-Tyrosinbasierte-Aktivierungs-Motive (ITAMs) auf der zytosolischen Seite ausgestattet sind. Der NKG2D-Rezeptor hingegen ist nicht direkt mit ITAMs assoziiert und bindet nicht-kovalent an den DAP10-Transmembran-Signaladapter. Dies gilt auch für Zytokinrezeptoren auf NK-Zellen und Integrine. Die inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen zeichnen sich durch ITIMs (Immunrezeptor-Tyrosinbasierte-Inhibierungs-Motive) aus, über welche Protein-Tyrosin-Phosphatasen, wie SHP-1 und SHP-2 aktiviert werden, die die Signaltransduktion der aktivierenden Rezeptoren antagonisieren. Zu den von NK-Zellen exprimierten ITAM-assoziierten Transmembran-Adapter-Proteinen gehören CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ , DAP10 und DAP12. Die nicht-kovalente Bindung zwischen diesen Adapter-Molekülen und aktivierenden Rezeptoren erfolgt über unterschiedliche, positiv-geladene Aminosäurereste innerhalb der Transmembranregionen. Mit DAP12 assoziieren CD94/NKG2C und der NCR NKp44 sowie einige KIR-Rezeptoren (KIR2D-S) und mit CD3 $\zeta$  und Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  die NCRs NKp30 und NKp46 sowie CD16 (Lanier 2003). Abbildung A5 (Seite 14) zeigt eine schematische Darstellung der aktivierenden NK-spezifischen Rezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46 sowie deren Adaptermoleküle und den Verlauf der Signaltransduktion. Bei Stimulation der Rezeptoren kommt es zu einer Phosphorylierung des ITAMs durch eine Kinase der src-Familie, wodurch Syk und ZAP70 rekrutiert werden. Nach weiteren Phosphorylierungen von SLP-76, 3BP2, Shc, PI3-Kinase, c-Cbl, Phospholipase C usw. und einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Zytosol wird die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) und die ERK-Kinase aktiviert (Vergleich Abbildung A5 der Einleitung).

Eine Stimulation über den FCR-Rezeptor III CD16 führt zur Produktion von Zytokinen (IFN- $\gamma$ , GM-CSF) und einiger Chemokine (MIP-1 $\alpha/\beta$ ) und zur Degranulation der NK-Zellen (ADCC). Eine Induktion von CD16 kann bei IL-2 stimulierten NK-Zellen jedoch auch zur Apoptose führen (Poggi, Massaro et al. 2005). Der aktivierende Rezeptor NKG2D assoziiert mit DAP10, der ein YxxM-Aminosäuremotiv (x = beliebiger Aminosäurerest) trägt. DAP10 bindet nach Phosphorylierung an die PI3-Kinase, wodurch die Janus-Kinase 2, STAT5, ERK, MAPK und PI3-Kinase/Akt Signaltransduktionswege angeschaltet werden (Sutherland, Chalupny et al. 2002) (Vergleiche Abbildung A4 der Einleitung). Andere aktivierende NK-Rezeptoren, wie 2B4 oder NTB-A enthalten TxYxxV/I-Motive in ihren zytoplasmatischen Domänen, die mit dem SLAM-assoziierten Protein (SAP) in Wechselwirkung stehen.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte die Signaltransduktion in verschiedenen NK-Zelllinien nach Induktion mit PMA und Ionomycin mittels Multiplex-Verfahren und Western-Blot-Assay verfolgt werden. Phorbolester wie PMA (Phorbolmyristat-Acetat) aktivieren die Proteinkinase C, Ionomycin führt zum Einstrom von Ca<sup>2+</sup> ins Zytosol. Proteinkinase C wird u.a. nach Stimulation des aktivierenden Rezeptors 2B4 (CD244) aktiviert. Die Stimulation von NK-

Zellen mittels PMA führt neben der Aktivierung der Proteinkinase C zu einer verstärkten Transkription des 2B4-Gens (Chuang, Lee et al. 2003). Allgemein lässt sich festhalten, dass Proteinkinase C an der Zytotoxizität der NK-Zellen beteiligt ist (Bonnema, Karnitz et al. 1994; Peter, Nawrath et al. 2002).

Die Stimulation der NK-Zelllinien mittels PMA und Ionomycin sollte daher eine einfache Möglichkeit bieten, die Signaltransduktion in verschiedener NK-Zelllinien und einer leukämischen T-Zelllinie (Jurkat) zu verfolgen. Im Zuge einer Zeitkinetik, bei der an spezifischen Zeitpunkten die Stimulation mit PMA und Ionomycin gestoppt wurde (0, 15, 30, 60 Minuten) konnte in Bezug auf die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2-MAP-Kinase ein deutlicher Unterschied zwischen der NKL- und der YT-Zelllinie beobachtet werden. Während bei der NKL im Verlauf der Zeit eine nahezu gleich bleibende relative Menge an phosphorylierter ERK1 und ERK2-Kinase, im Vergleich zur unstimulierten Situation (Stimulationsdauer = 0 Minuten) zu beobachten war, konnte ich bei der Zelllinie YT einen starken Anstieg der relativen Menge an pERK1/2 nachweisen, der mit Verlauf der Stimulationsdauer wieder abnahm. Die Beobachtungen des Multiplex-Verfahrens (Phosphoplex-Bestimmung) deckten sich dabei mit den Ergebnissen aus dem Western-Blot. Im Fall von GSK3 kommt es bei der NKL zu einem Anstieg der relativen Menge an pGSK3 nach 15 Minuten, die mit anhaltender Stimulationsdauer konstant bleibt. Bei der YT-Zelllinie wiederum konnte ich einen kurzen transienten Anstieg nach  $t = 15$  Minuten Stimulation beobachten, der im Verlauf der Zeit abnahm. Der Vergleich mit der Gesamtmenge an phosphoryliertem Protein zeigte, dass die Proteinmenge zu allen Zeitpunkten identisch war. Die Beobachtungen in Bezug auf pERK1/2 und GSK3 erscheinen somit valide und sind reproduzierbar. Im Fall der Phosphorylierung von STAT3-Kinase konnte nur bei der NKL-Zelllinie zum Zeitpunkt 60 Minuten eine Zunahme der relativen Menge an phosphorylierter Kinase beobachtet werden. STAT-Kinasen (Signal-Transduktoren und Aktivatoren der Transkription) werden vornehmlich durch die Bindung von Zytokinen an Zytokinrezeptoren aktiviert. STAT3 wird beispielsweise durch die Bindung von IL-2, IL-15, IL-6 und IL-10 an die entsprechenden Rezeptoren für diese Zytokine aktiviert, wobei durch die Zytokinbindung Jak-Kinasen (Janus-Familie Tyrosin-Kinasen) an Tyrosinresten phosphoryliert werden, an die anschließend STAT-Kinasen binden können. Interessanterweise dimerisieren STAT-Kinasen nach Phosphorylierung und erlangen dadurch die Fähigkeit, nach Translokation in den Zellkern an DNA zu binden und damit die Transkription zu beeinflussen (Leonard and O'Shea 1998). Interessant ist vor allem die unterschiedliche Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 bei NKL- und YT-Zellen, da der MAPK-Signalweg und insbesondere ERK2 bekanntermaßen für die Effektorfunktion von NK-Zellen wichtig ist. ERK2 beeinflusst die Mobilisierung und Verteilung von zytoplasmatischem Perforin und Granzym B zur immunologischen Synapse (IS), also der Kontaktzone mit der Zielzelle (Wei, Gamero et al.

1998). Wei et al. konnten auch nachweisen, dass eine ERK2-Aktivierung in YT-Zellen innerhalb von 5 Minuten nach Kontakt mit einer Zielzelle stattfindet, wobei dies mit der maximalen Verlagerung von Perforin und Granzym B zur IS korrelierte. Die von mir gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in NKL und YT ergänzen die Beobachtungen von Wei et al. in Bezug auf den Verlauf der Kinetik. So nimmt die relative Menge an pERK1/2 nach Aktivierung ab, was auf eine Abschaltung der Zytotoxizität aufgrund eines lang anhaltenden Stimulus schließen lässt. Denkbar wäre, dass NK-Zellen bei sehr lang anhaltendem Stimulus (in diesem Fall einen generalisierten Stimulus über PMA/Ionomycin) die aktivierenden Signaltransduktionswege wieder abschalten, bzw. die Sensitivität der Signaltransduktion an den starken Stimulus anpassen (Abnahme der relativen Menge an phosphorylierter Kinase im Verlauf der Zeit), um eine „Ermüdung“ der zytotoxischen Aktivität durch Verbrauch von Perforin und Granzym B, trotz konstitutiver Expression dieser Moleküle in NK-Zellen, entgegenzusteuern.

Interessant ist die diametral entgegengesetzte Signaltransduktion bei NKL-Zellen im Vergleich zu YT-Zellen. Generell ist die beobachtete Phosphorylierung von ERK1/2 bei der NKL im Vergleich zur YT schwächer (maximal 2,1-fach im Vergleich zu unstimulierten Situation bei NKL, 13-fach bei YT), bleibt jedoch über den gesamten Zeitverlauf nahezu konstant. Das würde dafür sprechen, dass bei der NKL-Zelllinie, die Phosphorylierung nach Stimulation eher gering ausfällt, jedoch über einen langen Zeitraum hinweg konstant bleibt. Die YT-Zelllinie zeigt hingegen eine schnelle starke Steigerung der relativen Menge an phosphorylierten ERK1/2-Kinasen, die relativ rasch wieder abfällt (von 13,28-fach auf 8,7-fach innerhalb 15 Minuten). Im Fall von STAT3 zeigt sich nach 60 Minuten Stimulation bei der NKL überraschend eine 3-fache Steigerung der relativen Menge an p-STAT3. Denkbar wäre es, dass die lang anhaltende Stimulation zu einer Erhöhung der Zytokinkonzentration im Medium führt, bedingt durch eine *de novo* Synthese, die nach 60 Minuten ausreichend groß ist, um zu einer Aktivierung von STAT3 über Zytokinrezeptoren auf den NK-Zellen zu führen. Bei der Zelllinie YT ist jedoch keine Zunahme der relativen Menge an p-STAT3 zu beobachten, was gegen das obige Argument in Bezug auf die Zytokinkonzentration im Medium spricht. Im Vergleich zum Western-Blot zeigt sich eine schwache, jedoch erkennbare Zunahme an p-STAT3 nach 60 Minuten bei der NKL, was mit den Daten aus dem Multiplex-Verfahren korreliert. Denkbar wäre auch, dass die Phosphorylierung von STAT3 erst nach der Aktivierung anderer Signaltransduktionswege erfolgt.

In einem weiteren Experiment wurde die relative Menge an phosphorylierten Kinasen und eines Inhibitors des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B der Zelllinien YT, NK92, von B.3NK-Zellen und der T-Zelllinie Jurkat nach Stimulation während 15 Minuten mit PMA und Ionomycin im Vergleich zur einer Positivkontrolle untersucht (ERK1/2, STAT3, Akt, GSK3- $\alpha/\beta$ , JNK und I $\kappa$ B $\alpha$ ). Samson et al. konnten zeigen, dass I $\kappa$ B $\alpha$ -defiziente NK-Zellen zu einer gestörten NK-

Maturation und einer verminderten Zahl an NK-Zellen in Mäusen führt (Samson, Memet et al. 2004). Beim Vergleich der Phosphorylierung verschiedener Kinasen bzw. des Inhibitors  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  nach Stimulation unterschiedlicher NK-Zelllinien und einer T-Zelllinie konnte ich zeigen, dass die T-Zelllinie allgemein eine stärkere Phosphorylierung wichtiger Signalkaskaden nach Stimulation mit PMA und Ionomycin aufweist, als die untersuchten NK-Zellen. Insbesondere im Fall von p-ERK1/2 zeigte sich eine, sogar über der Positivkontrolle liegende, relative Menge an phosphoryliertem Protein bei der T-Zelllinie. Eine signifikante Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B-Inhibitors  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  konnte ich nur bei der NK-Zelllinie YT und der T-Zelllinie Jurkat nach 15 Minuten Stimulation mit PMA/Ionomycin nachweisen. Eine signifikante Phosphorylierung von Akt über die PI3-Kinase konnte bei keiner der untersuchten Zelllinien gefunden werden. Bei den untersuchten NK-Zelllinien zeigte die NK92 eine allgemein abgeschwächte Phosphorylierung der untersuchten Kinasen im Vergleich zu der YT-Zelllinie und B.3NK-Zellen, vor allem aber im Fall der Jun-N-terminal-Kinase (JNK). Die Stimulation von CD16 auf NK-Zellen führt zur Phosphorylierung von Vav-1, p21Ras und Aktivierung von ERK-, JNK- und p38-Signalwegen (Milella, Gismondi et al. 1997; Chini, Boos et al. 2000; Trotta, Fettucciari et al. 2000). YT und die Zelllinie NK92 exprimieren kein CD16, es lässt sich jedoch bei der YT eine Phosphorylierung von JNK nachweisen, was darauf hinweisen könnte, dass zumindest der Signaltransduktionsweg in YT nicht gestört ist. Die CD16-positiven B.3NK-Zellen zeigen eine nahezu identische relative Menge an p-JNK, wie die YT, die NK92 zeigt keinerlei p-JNK. Möglicherweise ist neben der fehlenden CD16-Expression auf NK92 auch die Signaltransduktion über JNK in dieser Zelllinie gestört. Die NK Zellen der Klonierung B.3 (B.3NK) ähneln in ihrem Phosphorylierungsmuster sehr der immortalen Zelllinie YT. Die Zelllinie NK92 weicht entscheidend vom Muster der YT und B.3NK ab. Die Ergebnisse lassen auf eine große Plastizität der NK-Zellen schließen, wobei insbesondere etablierte NK-Zelllinien in Bezug auf die Zytokin-Freisetzung nach Stimulus und ihrem zytotoxischem Verhalten gegenüber unterschiedlichen Zielzellen sowie in Bezug auf die Signaltransduktion nach Stimulus voneinander abweichen. Im Zuge dieser Arbeit konnte somit ein Vergleich des Phänotyps, der Zytokin- bzw. Chemokinfreisetzung sowie der Zytotoxizität und Signaltransduktion einiger etablierter NK-Zelllinien und von Allo-NK-Zellen erarbeitet werden, wobei die große Plastizität von NK-Zellen auch bei etablierten Zelllinien widerspiegelt wird.

### 1.4 Expressionsmuster von CD6 auf Natürlichen Killerzellen

Die CD6-Depletion des Stammzellpräparats des Spenders bei einer haploidentischen Knochenmark- und Stammzelltransplantation dient der Entfernung eines Großteils der T-Zellen, die im Patienten ein akute bzw. chronische GvHD (Graft-versus-Host-Erkrankung)

auslösen könnten. Schon früh wurde durch Vergleich der Anzahl der NK-Zellen im Stammzellpräparat mit der Anzahl von NK-Zellen nach CD6-Depletion klar, dass auch NK-Zellen an anti-CD6-Antikörper binden und diese NK-Zellen somit einer Depletion unterliegen. Darüber hinaus war bekannt, dass einige NK-Zellen CD6 exprimieren (Swack, Mier et al. 1991) und das nur in CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen der Peripherie CD6 mRNA nachgewiesen werden kann (Koopman, Kopcow et al. 2003). Diese offensichtlich CD6-positiven NK-Zellen wurden jedoch vor Beginn der vorliegenden Arbeit phänotypisch oder funktionell nicht weiter untersucht.

Deshalb sollte der Einfluss der CD6-Depletion auf NK-Zellen im Stammzellpräparat des Spenders untersucht werden. Noch vor Beginn der Experimente mit Spendermaterial wurde versucht, aus PBL eines gesunden freiwilligen Spenders NK-Zellen zu isolieren und mittels IL-2 in Kultur zu nehmen. Diese sollten anschließend mit CD6-Antikörpern behandelt werden, die an magnetische Mikrosphären gebunden waren, um so CD6-positive NK-Zellen zu isolieren und funktionell zu untersuchen. Dabei konnte ich mittels AutoMACS CD6-positiv NK-Zellen isolieren, die durch die Stimulation mit IL-2 für 14 Tage fast alle (97%) stark CD56 auf der Oberfläche exprimierten. Dabei konnte ich auch beobachten, dass mindestens die Hälfte der CD6-positiven NK-Zellen auch CD16 exprimierten. Eine Auftrennung in Bezug auf die Expressionsdichte von CD56 war aufgrund der IL2-bedingten hohen CD56-Expression nicht möglich, die Expression von CD16 auf einem Hauptteil der CD6-positiven NK-Zellen legt jedoch die Vermutung nahe, dass vornehmlich CD56<sup>dim</sup>CD16-positiv NK-Zellen CD6 exprimieren. Dieser Versuch konnte also einen ersten Hinweis auf die Funktion von CD6 als differentieller Marker für eine NK-Subpopulation geben. Bisher unterteilt man periphere NK-Zellen aufgrund der Expression von CD56 in CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen und CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, die sich auch in ihrer Funktion voneinander unterscheiden. CD6 könnte möglicherweise als neuer Marker diese beiden Populationen voneinander differenzieren.

In einem anschließenden Chromfreisetzungsversuch konnte ich zeigen, dass diese CD6-positiven, stark CD56-exprimierenden NK-Zellen im Vergleich zur CD6-negativen Fraktion so gut wie keine spezifische Lyse von Zielzellen auslösten. Die CD6-negative Fraktion ergab eine starke Lyse von K-562-Zellen, die durch die Expression von HLA-E auf K-562-E-Transfektanten abgeschaltet werden konnte. Auch gegen L721.221 Zellen zeigte die CD6-negative Fraktion eine starke spezifische Lyse, die bei Stimulation einer HLA-C-Transfektante von L721.221 um ca. die Hälfte abnahm. Die CD6-positiven NK-Zellen bewirken möglicherweise aufgrund der anhaltenden Bindung der bei der Depletion eingesetzten magnetischen Mikrosphären (an die anti-CD6-Antikörper gekoppelt sind) keine Lyse gegenüber Zielzellen. Vankayalapati et al. konnte bei NK-Zellen, die sie mittels positiver Selektion aus PBMC isolierten jedoch eine spezifische Lyse gegenüber Zielzellen



nachweisen (Vankayalapati, Garg et al. 2005). So stellt sich auch die Frage, ob die lange Kultivierung mit IL-2 einen Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zellen hatte. Da die CD6-negative Fraktion jedoch auch nach 14 Tagen IL-2 Stimulation (300 Einheiten IL-2 pro ml) eine spezifische Lyse von Zielzellen zeigten, kann dies ausgeschlossen werden. In T-Zellen vermittelt CD6 zusammen mit costimulatorischen Signalen über CD2 und CD3 eine Aktivierung, weiterhin ist eine Assoziierung mit CD5 bekannt (Swack, Mier et al. 1991; Zimmerman, Joosten et al. 2006). Hassan et al. konnten jedoch belegen, dass eine Blockierung mit löslichem, monomeren CD6 zu einer Blockierung der CD6/CD166 Wechselwirkung führt und dadurch die Antigen-spezifische Antwort von T-Zellen inhibiert (Hassan, Barclay et al. 2004). Die starke Bindung der anti-CD6-Antikörper auf den magnetischen Mikrosphären, die nach CD6-Depletion trotz Waschen noch an CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen gebunden vorliegen, könnte auch in NK-Zellen einen direkten Einfluss auf die CD6-vermittelte Signaltransduktion haben und deren zytotoxische Aktivität einschränken. Denkbar wäre eine Abschaltung des betreffenden stimulierenden Signalwegs in CD6-positiven NK-Zellen nach lang anhaltender Überstimulation durch die anti-CD6-Antikörper auf den Mikrosphären.

### **2. Relevanz der Natürlichen Killerzellen bei der haploidentischen Knochenmark- und Stammzelltransplantation**

Die allogene Knochenmark- bzw. hämatopoetische Stammzellentransplantation ist das Mittel der Wahl bei der Behandlung hämatopoetischer Tumorerkrankungen. Die Transplantation mit in Bezug auf humane Leukozyten-Antigene (HLA) angepassten Transplantaten verwandter Spender (Geschwister) führt durch die Alloreaktivität der transplantierten T-Zellen zu einer Eradikation der Leukämie und darüber hinaus zu einem schnellen Anwachsen des Transplantats und einer Rekonstitution des Immunsystems im Patienten, wobei das Risiko einer lebensbedrohlichen Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) aufgrund der HLA-Anpassung zwischen Spender und Patient relativ gering ausfällt (Kolb, Schmid et al. 2004). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein beliebiges Geschwisterpaar dieselben HLA-Haplotypen vererbt bekommen hat, liegt jedoch bei 1 zu 4. In den meisten Industrienationen finden 40% der Patienten einen HLA-identischen Spender, wobei es sich um ein Geschwisterpaar handelt (Ruggeri, Mancusi et al. 2005). Trotz mehr als 7 Millionen registrierter und HLA-typisierter Spendern weltweit, finden aufgrund der HLA-Diversität nur 60 – 70% aller kaukasischer Patienten und weniger als 10% der Patienten mit anderem ethnischen Hintergrund einen passenden Spender. Eine Möglichkeit zur Behandlung von Patienten, die keinen passenden Spender finden, oder nicht innerhalb eines angemessenen Zeitraums, stellt die haploidentische hämatopoetische Stammzelltransplantation dar. Nahezu jeder Patient hat

ein verwandtes Familienmitglied, dass in Bezug auf die HLA-Ausstattung zum Patienten haploidentisch ist, d.h. Patient und verwandter Spender teilen einen identischen HLA-Haplotyp und sind in Bezug auf den anderen HLA-Haplotyp vollständig fehlangepasst. Ein großes Problem der haploidentischen Stammzell- und Knochenmarktransplantation stellen jedoch alloreaktive T-Zellen des Spenders dar, die MHC-Antigene im Patienten erkennen und Gewebe angreifen und dadurch eine schwere akute Graft-versus-Host-Erkrankung auslösen können. Die vollständige Depletion von T-Zellen des Transplantats *ex vivo* verhindert eine akute GvHD und zusammen mit einer Hochdosis-Verabreichung von Stammzellen, die durch G-CSF-Mobilisierung aus dem Spender gewonnen werden, und einer immunsuppressiven Behandlung des Patienten zur Unterdrückung einer Host-versus-Graft-Reaktion kann ein gutes Anwachsen (*engraftment*) des Transplantats, ein vollständiger Chimerismus und Toleranz erreicht werden. Die Alloreaktivität der T-Zellen spielt jedoch bei der Eradikation der Leukämiezellen eine entscheidende Rolle. Ruggeri und Velardi haben in einer wichtigen Arbeit gezeigt, dass Natürliche Killerzellen, die sich schnell aus den transplantierten Stammzellen des Spenders rekonstituieren, bei einer Fehlanpassung der Liganden auf Patientenzellen in Bezug auf inhibitorische KIR-Rezeptoren auf den NK-Zellen des Spenders Alloreaktivität gegenüber den Leukämiezellen des Patienten besitzen (Ruggeri, Capanni et al. 2002). Im Zuge der vorliegenden Arbeit habe ich die Relevanz Natürlicher Killerzellen bei der haploidentischen Knochenmark- und Stammzelltransplantation untersucht.

### **2.1 Depletion von T-Zellen und einer Gruppe von NK-Zellen, Anreicherung hämatopoetischer Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) durch Depletion mittels monoklonaler anti-CD6-Antikörper**

Soiffer et al. konnten zeigen, dass die Depletion von T-Zellen mittels CD6-Depletion bei nicht-verwandten, HLA-angepassten Spender im Zuge einer Knochenmarktransplantation zur Verminderung des Risikos einer GvHD wirksam eingesetzt werden kann (Soiffer, Fairclough et al. 1997). Reinherz et al. stellten fest, dass eine CD6-Depletion keinen Einfluss auf NK-Zellen, Monozyten oder andere hämatopoetische Zellen hat (Reinherz, Geha et al. 1982). Ich konnte im Zuge dieser Arbeit belegen, dass der in der III. Medizinischen Klinik der LMU, Großhadern bei der CD6-Depletion eingesetzte anti-CD6-Antikörper MT-606 CD6-positive NK-Zellen bindet, wodurch NK-Zellen aus dem PBSC-Präparat der Spender depletiert werden. Durch die CD6-Depletion des durch G-CSF-Mobilisierung erhaltenen PBSC-Präparats kommt es bei allen von mir untersuchten Spendern (n = 36) zu einer Anreicherung von CD34<sup>+</sup>-Stammzellen im Transplantat (CD6-depletiertes PBSC) und gleichzeitig zu einer Depletion einer Population von NK-Zellen, die ich näher phänotypisch

charakterisieren konnte. Dabei konnte ich zeigen, dass alle CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen der Peripherie CD6 exprimieren und aufgrund der Spezifität des Antikörpers MT-606 (anti-CD6-Antikörper) größtenteils depletiert werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Koopman et al. aus dem Jahr 2003, die nachweisen konnten, dass nur in CD56<sup>dim</sup>-Zellen aus peripherem Blut mRNA für CD6 exprimiert wird, nicht jedoch in CD56<sup>bright</sup>-Zellen, die ca. 10% der peripheren NK-Zellen im gesunden Menschen ausmachen (Koopman, Kopcow et al. 2003). Die Oberflächenexpression von CD6 auf NK-Zellen stellt somit einen differentiellen Marker für NK-Zellen dar, der zwischen verschiedenen NK-Subpopulationen unterscheiden kann. Ich konnte nachweisen, dass es durch die CD6-Depletion zu einer statistisch signifikanten Depletion von CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen kommt ( $p = 0,0006$ ,  $n = 26$ ) und vornehmlich CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen im Transplantat verbleiben. Die Bindungsaffinität des für die CD6-Depletion verwendeten Antikörpers wurde von der Klinik so gewählt, dass eine relativ scharfe Abtrennung von ca. 97 – 99% aller T-Zellen erreicht wird, gleichzeitig werden jedoch einige CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen, die CD6 nur in sehr geringer Dichte auf der Oberfläche exprimieren, von der Depletion ausgespart. Dies führt dazu, dass ich im CD6-depletierten Präparat immer noch CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD6<sup>-</sup>-NK-Zellen nachweisen konnte. Um einen möglichen Einfluss der G-CSF-Mobilisierung auf die Verteilung der beiden Hauptpopulationen der NK-Zellen im peripheren Blut auszuschließen, wurden Proben aus Normalspender und G-CSF-mobilisierten Spender in Bezug auf die CD5<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> und CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>-Verteilung durch FACS-Analyse untersucht. Dabei konnte ich zwischen  $n = 12$  Normalspendern und  $n = 23$  G-CSF-mobilisierten Spendern keinen Unterschied feststellen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Durek et al. und Lassailly, die keine Effekt von G-CSF auf den Phänotyp von NK-Zellen nachweisen konnten. Darüber hinaus scheinen NK-Zellen keine G-CSF-Rezeptoren zu exprimieren (Durek, Schafer et al. 1997; Miller, Prosper et al. 1997; Lassailly, Sielleur et al. 2005)

### **2.2 Modulation des NK-Zellrepertoires aufgrund der CD6-Depletion**

Aufgrund der CD6-Depletion kommt es zu einer Modulation des NK-Zellrepertoires. So konnte ich im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals den Einfluss einer CD6-Depletion auf das NK-Repertoire mittels FACS-Analyse der Expression von KIR-Rezeptoren und NCRs und anderer wichtiger NK-Rezeptoren untersuchen. Dabei konnte ich zeigen, dass KIR2DL1/DS1-, KIR2DL2/3 bzw. KIR2DS2/3- und KIR2DS4-positive NK-Zellen durch die CD6-Depletion statistisch signifikant depletiert werden, nicht jedoch KIR3DL1/DS1-positive NK-Zellen. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Jacobs et al. (Jacobs, Hintzen et al. 2001), die nachweisen konnten, dass CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen im Gegensatz zu CD56<sup>bright</sup>-Zellen KIR2DL1/DS1, KIR2DL2/3 bzw. KIR2DS2/3 und NKG1 exprimieren. CD94, NKG2A und

NKG2D konnte ich auf allen NK-Zellen in den Präparaten vor und nach Depletion nachweisen. Auch in Bezug auf die NCR-Rezeptoren Nkp30 und Nkp46 konnte ich keinen Unterschied zwischen der CD56<sup>dim</sup>- und der CD56<sup>bright</sup>-Population nachweisen. Nkp44 konnte nicht auf den NK-Zellen der untersuchten G-CSF-mobilisierten Spenderpräparate nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass die *ex vivo* Depletion oder G-CSF-Mobilisierung nicht zu einer Aktivierung von NK-Zellen führt.

### **2.3 Veränderung der Funktion des im Transplantat verbleibenden NK-Repertoires im Vergleich zu NK-Zellen aus PBSC**

Da es durch die CD6-Depletion zu einer Verschiebung der NK-Population im Transplantat kommt, insbesondere zu einer Anreicherung KIR-negativer CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, sollte die Funktion der im Transplantat verbleibenden CD6-negativen NK-Zellen im Vergleich zu NK-Zellen des Stammzellpräparats vor Depletion untersucht werden. Ursprünglich sollten dazu NK-Zellen aus dem Stammzellpräparat und dem CD6-depletierten Stammzellpräparat mittels negativer NK-Isolation gewonnen und anschließend funktionell untersucht werden.

#### **2.3.1 Isolierung von NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletierten PBSC**

Aufgrund der langen Stehzeit der Präparate durch Ausschleusung aus dem Reinraum der III. Medizinischen Klinik der LMU und der verwendeten Puffer bei der Leukapharese zur Verhinderung der Gerinnung der Präparate sind die Zellen der Präparate mechanischen und zellulärem Stress ausgesetzt. Ursprünglich wurden die von der Klinik bezogenen Präparate aufgrund logistischer Überlegungen nach FACS-Analyse direkt aliquotiert und kryokonserviert. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Einfriervorgang, der gemäß herkömmlicher Verfahren durchgeführt wurde, vor allem aber das Auftauen zu einer starken Agglutination der Zellen führte, wodurch die Ausbeute an lebenden Zellen stark vermindert war. Deshalb wurde eigens ein Auftauverfahren konzipiert, mit dem die Verluste an Zellen beim Auftauvorgang minimiert werden konnten. Trotz dieser Maßnahme konnte jedoch aus den aufgetauten Präparaten nur unter allergrößten Schwierigkeiten NK-Zellen mittels negativer NK-Isolation isoliert werden. So konnte gerade einmal Ausbeuten von 1 – 2 % in Bezug auf die Ausgangszellzahl erzielt werden, wodurch anschließende funktionelle Versuche (Chromfreisetzungssassay etc.) nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich waren. Von 6 Versuchen konnte nur bei einem eine ausreichende Anzahl an NK-Zellen isoliert werden, um die spezifische Lyse der isolierten NK-Zellen gegenüber Zielzellen zu bestimmen. Es konnte jedoch keine zytotoxische Aktivität der isolierten NK-Zellen aus dem Stammzellpräparat, noch aus dem CD6-depletierten Stammzellpräparat nachgewiesen

werden. Dies kann durch die mechanische Belastung der Zellen durch das Auftauen und die negative NK-Zellisolation bedingt sein.

### 2.3.2 Zytotoxizität und Degranulation von NK-Zellen in PBSC und CD6-depletierten PBSC

Da ein Nachweis der Zytotoxizität mit isolierten NK-Zellen aus dem Stammzellpräparat bzw. CD6-depletierten Stammzellpräparat aufgrund der geringen Ausbeuten und einer fehlenden Aktivität der isolierten NK-Zellen gegenüber Zielzellen nicht möglich war, wurden Zellen aus den Präparaten ohne vorherige Isolierung der NK-Zellen direkt in einem Chromfreisetzungsversuch eingesetzt. Dabei zeigte sich nur bei einem Spender im Chromfreisetzungsversuch eine, wenn auch geringe spezifische Lyse von Zielzellen, die durch den Einsatz von HLA-E-positiven Transfektanten als Zielzellen einer Abschaltung unterlag. Dies konnte durch eine Wiederholung des Versuchs mit Zellen desselben Spenders bestätigt werden, nicht jedoch im Fall eines anderen Spenders. Somit konnte ich zumindest in einem Fall nachweisen, dass es durch die Zellen im Stammzellpräparat und im CD6-depletierten Stammzellpräparat zu einer Lyse von NK-sensitiven Zielzellen kommt, wobei auch die Abschaltung über HLA-E und HLA-C gezeigt werden konnte. Aufgrund der technischen Schwierigkeiten, und um einen spezifischen Nachweis der Lyse durch NK-Zellen zu erbringen, sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit der CD107a-Degranulations-Assay als Lysenachweis eingesetzt werden. Die Zytotoxizität der NK-Zellen basiert auf der gerichteten Exozytose sekretorischer Lysosomen, die lytische Proteine, wie beispielsweise Perforin, Granzyme und Fas-Ligand enthalten (Trapani and Smyth 2002; Bossi and Griffiths 2005). Die sekretorischen Lysosomen enthalten einen dichten Kern, in dem die lytischen Proteine enthalten sind, der von einer Lipid-Doppelschicht umgeben ist, die lysosomal-assoziierte Membranglykoproteine (LAMPs, *lysosomal-associated membran glycoproteins*) und Fas-Ligand umfasst (Peters, Borst et al. 1991; Bossi and Griffiths 1999). Eine Degranulation führt in zytotoxischen T-Zellen zur Expression von CD107a (LAMP-1) an der Zelloberfläche und gleichzeitig zur Depletion intrazellulären Perforins (Betts, Brenchley et al. 2003; Faroudi, Utzny et al. 2003). Bryceson et al. haben gezeigt, dass CD107a mit Perforin kolokalisiert ist, und dass CD107a mittels FACS-Analyse nicht auf ruhenden nachweisbar ist. Nach Inkubation mit K-562-Zellen während zwei Stunden konnte jedoch eine CD107a-Expression nachgewiesen werden, die mit der spezifischen Lyse von K-562 korrelierte, die mittels Chromfreisetzungsversuch nachgewiesen wurde (Bryceson, March et al. 2005). Im Zuge meiner Arbeit konnte ich bei anhand von 6-Spenderpräparaten zeigen, dass CD56<sup>+</sup>CD3ε<sup>-</sup>-NK-Zellen nach Kontakt mit MHC-negativen Zielzellen (K-562) während 3 Stunden CD107a auf der Oberfläche exprimieren. Bei Inkubation mit HLA-E-Transfektanten

von K-562 konnte ich bei allen Spendern eine Abnahme der CD107a-Degranulation nachweisen. Im Fall der CD6-depletierten Stammzellpräparate der 6 Spender war die Zunahme der CD107a-Degranulation nach Stimulation mit K-562 statistisch signifikant ( $p = 0,015$ ,  $n = 6$ ). Die beobachtete Abschaltung im Fall der Stimulation von NK-Zellen aus den CD6-depletierten Stammzellpräparaten war ebenfalls signifikant ( $p = 0,0311$ ,  $n = 6$ ). Bei den Stammzellpräparaten der Spender vor CD6-Depletion konnte ein identisches Muster der Degranulation nachgewiesen werden, das jedoch nicht statistisch signifikant war. Interessant ist die Tatsache, dass die CD6-depletierte NK-Population einen generell verringerten Schwellenwert der Degranulation bei Fehlen eines Stimulus im Vergleich zu NK-Zellen des Stammzellpräparats aufweist. D.h., dass weniger NK-Zellen im CD6-depletierten Präparat eine unspezifische CD107a-Expression aufweisen, die jedoch nach Stimulus stark ansteigt. Die NK-Zellen des CD6-depletierten Präparats befinden sich also in einem, im Vergleich zum undepletierten Präparat (PBSC), stärker ausgeprägten ruhenden Zustand mit geringerer Hintergrundaktivität, der durch Stimulus signifikant in eine spezifische Aktivierung durch Zielzellen umschlägt. Möglicherweise selektioniert die CD6-Depletion auf NK-Zellen, die einen höheren Schwellenwert für Aktivierungssignale aufweisen. Bei der Untersuchung der Degranulation von NK-Zellen nach Stimulation mit L721.221-Zellen konnte ich erste Hinweise darauf finden, dass es zwischen den zwei Hauptpopulationen von NK-Zellen ( $CD56^{\text{dim}}$  und  $CD56^{\text{bright}}$ ) Unterschiede bei der Erkennung von Zielzellen gibt. So konnte ich bei einem Spender beobachten, dass  $CD56^{\text{bright}}$ -Zellen nach Stimulation mit L721.221-Zellen im Vergleich zur Stimulation durch K-562-Zellen stärker degranulierten (Daten nicht gezeigt). Dies würde dafür sprechen, dass die Unterscheidung von  $CD56^{\text{bright}}$ -Zellen und  $CD56^{\text{dim}}$ -NK-Zellen aufgrund der Einteilung in zytotoxisch wirkende Zellen ( $CD56^{\text{dim}}$ -NK) und Zytokin-sezernierende  $CD56^{\text{bright}}$ -Zellen stark vereinfacht ist. Möglicherweise entscheidet der Phänotyp der Zielzelle darüber, welche NK-Subpopulation zytotoxisch wirksam wird. Diese ersten Hinweise werden zurzeit im Rahmen weiterer Arbeiten der Arbeitsgruppe Falk untersucht. Zusammenfassend konnte ich erfolgreich zeigen, dass die nach CD6-Depletion im Transplantat enthaltenen Natürlichen Killerzellen die Fähigkeit zur zytotoxischen Lyse von Zielzellen besitzen und diese Aktivität durch die Expression bestimmter MHC-Moleküle abgeschaltet werden kann. Das transplantierte NK-Zell-Kompartiment des Spenders ist somit in seiner Funktion in Bezug auf die Zytotoxizität nicht beeinträchtigt. Eine weitere wichtige Frage im Rahmen der vorliegenden Arbeit war, ob NK-Zellen im Stammzellpräparat und CD6-depletierten Stammzellpräparat nach Stimulation mit Zielzellen zu einer Proliferation in der Lage sind.

### **2.3.3 Proliferation von NK-Zellen aus PBSC und CD6-depletiertem PBSC nach Stimulation**

Ich konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit belegen, dass NK-Zellen aus den Stammzell- und CD6-depletierten Stammzellpräparaten von insgesamt 10 G-CSF-mobilisierten Spendern nach Stimulation mit MHC-Klasse-negativen Zielzellen während 5 Tage proliferieren, wobei im Fall der CD6-depletierten Stammzellpräparate eine statistisch signifikante Zunahme ( $p = 0,0046$ ,  $n = 10$ ) der Proliferation nach Stimulation mit K-562-Zellen erfolgt. Darüber hinaus kommt es durch die Expression von HLA-E auf K-562-Transfektanten im Vergleich zur Stimulation mit Wildtyp-K-562-Zellen zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Proliferation ( $p = 0,0311$ ,  $n = 10$ ), also zu einer HLA-E-spezifischen Abschaltung der Proliferation. Wie bei den Untersuchungen zur Degranulation (CD107a-Expression) kommt es bei den nicht CD6-depletierten PBSC zwar zu einer deutlichen Zunahme der Proliferation nach Stimulus und auch zu einer deutlichen Abschaltung über HLA-E, wobei jedoch keine statistische Signifikanz belegt werden konnte. Voss et al. haben gezeigt, dass es nach Stimulation durch K-562-Zellen bei CD56<sup>dim</sup>- und CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen zu einer nahezu identischen Proliferation kommt, wobei jedoch diskutiert wurde, ob die Kostimulation der beiden NK-Subpopulationen möglicherweise über unterschiedliche Rezeptoren verläuft. Bei CD56<sup>bright</sup>-Zellen zeigte sich nach Stimulation über CD94 ein Anstieg der Proliferation, nicht jedoch bei CD56<sup>dim</sup>-Zellen (Voss, Daley et al. 1998). Vitale et al. konnten zeigen, dass nach Interaktion mit Dendritischen Zellen nur CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup>-NK-Zellen proliferieren, nicht jedoch CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen (Vitale, Della Chiesa et al. 2004). Die im CD6-depletierten Präparat hauptsächlich vorliegenden NK-Zellen zeigen einen CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup> Phänotyp. Möglicherweise sind diese CD56<sup>bright</sup>CD6<sup>-</sup>KIR<sup>-</sup>-NK-Zellen im Vergleich zu CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>+</sup>-NK-Zellen, die sich im undepletierten Präparat finden, in der Lage spezifischer auf den Stimulus durch Zielzellen mit Expansion und Proliferation zu reagieren. Batoni et al. haben gezeigt, dass CD56<sup>bright</sup>-Zellen die NK-Zellsubpopulation charakterisieren, die nach Stimulation mit BCG (*Mycobacterium vobis bacillus Calmette-Guérin*, BCG) zur Proliferation angeregt werden, und schließen daraus, dass CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen für die Proliferation und Zytokin-Sekretion prädestiniert sind (Batoni, Esin et al. 2005). Eine mögliche Erklärung für die statistisch signifikante Zunahme der Proliferation von NK-Zellen aus dem CD6-depletierten Stammzellpräparat könnte in der Tatsache begründet sein, dass die CD6-Depletion, wie von mir gezeigt, zu einer Anreicherung von CD56<sup>bright</sup>CD6<sup>-</sup>-NK-Zellen führt, die nach Stimulation stärker einer Proliferation unterliegen. Interessant ist die Beobachtung, dass diese CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen dennoch eine ausgeprägte Zytotoxizität gegenüber Zielzellen besitzen, was die herkömmlichen These der eher in Richtung der Zytokinfreisetzung gehenden Aktivität von CD56<sup>bright</sup>-Zellen in Frage stellt. Bei der Untersuchung der T-Zellen und B-Zellen der Präparate konnte ich nach Stimulation mit K-562-Zellen keine Proliferation nachweisen.

### 2.3.4 Freisetzung von Zytokinen bzw. Chemokinen aus Zellen der PBSC- und CD6-depletierten PBSC-Fraktion nach Stimulation mit Zielzellen

NK-Zellen, insbesondere CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, sezernieren eine Reihe von Zytokinen- und Chemokinen, wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 sowie MIP-1 $\beta$ , IL-8 und GM-CSF (Biron, Nguyen et al. 1999; Moretta 2002; O'Shea, Ma et al. 2002; Robertson 2002; Sconocchia, Keyvanfar et al. 2005). Ich habe im Zuge der vorliegenden Arbeit das Zytokin- bzw. Chemokinfreisetzungsmuster der Stammzellpräparate und CD6-depletierten Stammzellpräparate 8 verschiedener Spender mittels Multiplex-Technologie untersucht. Dadurch konnte ich feststellen, dass nach Stimulation mit K-562 Zellen während 24 Stunden IL-6, IL-8 und MIP-1 $\beta$  sezerniert werden. Im Fall des Chemokins IL-8 konnte ich bei den untersuchten CD6-depletierten Stammzellpräparaten von 8 Spendern im Vergleich zur unstimulierten Situation eine statistisch signifikante Zunahme der Freisetzung des Chemokins nach Stimulation nachweisen ( $p = 0,028$ ,  $n = 8$ ). Saito et al. konnten zeigen, dass reziduale CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen ohne Stimulation große Mengen IL-8 sezernieren (Saito, Kasahara et al. 1994). Bei IL-8 handelt es sich um einen Chemoattraktant, der Neutrophile, Basophile und T-Zellen zum Ort einer Entzündung lockt, IL-8 ist allerdings auch an der Angiogenese und Hämatopoese beteiligt (Baggiolini, Dewald et al. 1994; Baggiolini, Dewald et al. 1997; Rollins 1997). IL-6 und IL-8 werden normalerweise bei systemischen Infektionen im Serum in erhöhter Konzentration nachgewiesen und sind ein Hinweis für die Aktivierung von Leukozyten. Die beobachteten Konzentrationen für IL-6 und IL-8 waren auch in den unstimulierten Ansätzen erhöht, was darauf schließen lässt, dass die G-CSF-Mobilisierung möglicherweise zu einer Erhöhung der Zytokinfreisetzung und insbesondere der Freisetzung von IL-6 und IL-8 führt. Bei den Untersuchungen der Zytokin/Chemokinfreisetzung von NK-Zelllinien im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte ich die Sekretion von IL-8 bei den Zelllinien NKL, B.3NK-Zellen, NK92 und YT nach Stimulation über den aktivierenden Rezeptor 2B4 (CD244) nachweisen. IL-6 wird nur von den Zelllinien NKL, YT und NK92, nicht von B.3NK-Zellen freigesetzt. Da bei der Untersuchung der Zytokinsekretion bzw. Chemokin-Freisetzung aus Zellen der Stammzellpräparate mehrere verschiedene Zellen als Quelle der Zytokine bzw. Chemokine in Frage kommen, kann nicht eindeutig geklärt werden, welche Zellart für die erhöhte Sezernierung von IL-8 bzw. IL-6 nach Stimulation mit K-562-Zellen verantwortlich ist. Eine Möglichkeit zur Klärung dieser Frage wäre die intrazelluläre Färbung der Zytokine bzw. Chemokine mit markierten Antikörpern. Bei gleichzeitiger Färbung gegen spezifische Zellmarker könnte so spezifisch die Zytokin- bzw. Chemokin-sezernierende Population aus dem Zellgemisch der Präparate isoliert werden. Dies setzt jedoch ein FACS-Analysegerät voraus, beispielsweise das LSR-II von BD, dass in der Lage ist, mehr als vier Fluoreszenzen gleichzeitig zu bestimmen, um die



Zellpopulationen genau voneinander abgrenzen zu können. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit stand ein solches Gerät jedoch noch nicht zur Verfügung.

Der intrinsische Effekt von IL-6 ist noch weitgehend ungeklärt. Interessant ist die Frage, was die Freisetzung von IL-6 aus den Zellen des Transplantats für eine Wirkung im Patienten entfaltet. Emilie et al. konnten zeigen, dass die Verabreichung eines monoklonalen anti-IL-6-Antikörpers in einigen Fällen das Wachstum von HIV-bedingten non-Hodgkin-Lymphomen verringert, was darauf schließen lässt, dass das Wachstum der entarteten Zellen IL-6-abhängig sein kann (Zhang, Klein et al. 1989; Emilie, Wijdenes et al. 1994). Da die von mir untersuchten Spenderzellen auch nach 48 Stunden Stimulation konstante Mengen an IL-6 sezernierten, stellt sich die Frage, ob die *de novo* Synthese dieses Zytokins durch Spenderzellen im Patienten einen Einfluss auf den Behandlungsverlauf hat. Bekannt ist, dass IL-6 die zytotoxische Wirkung von Chemotherapeutika auf entartete Zellen einschränken kann (Sachs and Lotem 1993). Emilie et al. diskutieren daher in ihrer Veröffentlichung, ob eine Verabreichung von IL-6-Antagonisten (monoklonale anti-IL-6-Antikörper) die Behandlung von Lymphomen unterstützen kann.

### **2.4 Einfluss der HLA-C-Gruppen auf das Überleben der Patienten**

Die Funktion humaner NK-Zellen wird von inhibitorischen KIR-Rezeptoren beeinflusst, die Epitope der HLA-C und HLA-B-Allele erkennen. Gemäß der „*at least one*“-Hypothese wird auf jeder NK-Zelle mindestens ein inhibierender Rezeptor für ein Selbst-HLA-C-Molekül exprimiert. Daher ergibt sich bei Kontakt einer NK-Zelle mit einer allogenen Zielzelle, die keine passenden Liganden (HLA-Klasse-I-Moleküle) für die inhibitorischen Rezeptoren tragen, eine potentielle Alloreaktivität der NK-Zelle gegenüber der Zielzelle. Solche Spender versus Empfänger Alloreaktionen von NK-Zellen ergeben sich bei einer vollständig HLA-fehlangepassten, also haploidentischen, hämatopoetischen Transplantation, die in der Graft-versus-Host-Richtung in Bezug auf die KIR-Liganden fehlangepasst ist. Ruggeri et al. konnten zeigen, dass diese Spender versus Empfänger NK-Zell-Alloreaktivität bei 57 untersuchten AML zu einem verminderten Rezidivrisiko, verringerter GvHD und zu einem besseren Anwachsen des Transplantats führten (Ruggeri, Capanni et al. 2002). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass nach der Transplantation von alloreaktiven NK-Zellen des Spenders eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten eintritt (HLA-angepasstes Transplantat aus einem nicht-verwandten Spender) (Ruggeri, Mancusi et al. 2006).

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte ich durch die hochauflösende Bestimmung der HLA-C-Allele der Spender und korrespondierenden Patienten eine retrospektive statistische

Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mittels Kaplan-Meier-Schätzer durchführen. Dabei zeigte sich bei Betrachtung der Spender-Patient-HLA-C-Allelkombination (also der Einteilung in eine der vier Gruppen gemäß Tabelle T2.10, Ergebnisteil) von 50 Patienten mit unterschiedlichen Leukämieformen ein statistisch nicht signifikanter Vorteil für HLA-C-heterozygote Patienten, die mit einem ebenfalls heterozygoten Spender transplantiert wurden. Ein annähernd gutes Überleben ergab sich bei homozygoten Patienten, die mit einem heterozygoten Spender transplantiert wurden. Dies würde der „KIR-Ligand-Mismatch-Situation“ gemäß Velardi entsprechen. In Bezug auf die HLA-C-Allele hatten heterozygote Patienten mit einem homozygoten Spender bei dem von mir untersuchten Patientenkollektiv die geringste Überlebenswahrscheinlichkeit. Da allerdings ein zur „Perugia-Gruppe“ gehöriger Patient unter einem myelodysplastischem Syndrom litt und 52 Monate überlebte, würde sich der Überlebensvorteil für Patienten, die gemäß der KIR-Ligand-Mismatch-Situation transplantiert wurden bei Herausnahme dieses Patienten aus der Berechnung drastisch verschlechtern. So kann festgehalten werden, dass bei gleichzeitiger Betrachtung verschiedener Leukämieformen das KIR-Ligand-Mismatch-Modell nach Velardi kein prognostisches Mittel zur Einschätzung des Überlebens der Patienten bietet. Daher wurde in einer weiteren statistischen Berechnung das Überleben in Bezug auf die HLA-C-Spender-Patienten-Kombination nach Leukämieformen unterteilt durchgeführt. AML-Patienten stellten dabei die größte Gruppe des von mir untersuchten Patientenkollektivs ( $n = 24$ ). Im Fall der AML-Patienten ergab sich für homozygote Patienten, die mit Zellen eines homozygoten Spenders transplantiert wurden ein statistisch nicht signifikanter Überlebensvorteil gegenüber den anderen Kombinationen. Patienten, die in die KIR-Ligand-Mismatch-Gruppe gemäß Velardi fielen, zeigten die schlechteste Überlebenswahrscheinlichkeit. Der oben schon genannte Patient mit MDS fällt bei Betrachtung von AML-Leukämiepatienten heraus. Somit zeigt sich kein Überlebensvorteil mehr für Patienten der „Perugia-Gruppe“. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu den Beobachtungen von Ruggeri und Velardi. Auch andere Studien haben keinen Überlebensvorteil für gemäß KIR-Ligand-Mismatch transplantierte Patienten zeigen können (Davies, Ruggieri et al. 2002; Lowe, Turner et al. 2003; Bornhauser, Schwerdtfeger et al. 2004; Zhao, Huang et al. 2007). Bislang wurde diese Diskrepanz mit Verweis auf verschiedene Behandlungsprotokolle und Leukämieformen der einzelnen Studienkollektive entkräftet (Ruggeri, Aversa et al. 2006). Die von mir erbrachten Ergebnisse beziehen sich jedoch auf zwei AML-Patienten, die gemäß der KIR-Ligand-Mismatch-Situation transplantiert wurden. Eine endgültige Aussage kann also erst mit einer größeren Fallzahl, d.h. einem größeren Patientenkollektiv gemacht werden, das zum Zeitpunkt dieser Arbeit jedoch nicht zur Verfügung stand. Bei Betrachtung der ALL-Patienten in Bezug auf die Spender-Patient-HLA-C-Allelkombinationen konnte ich einen statistisch nicht signifikanten Überlebensvorteil für heterozygote Patienten zeigen, die mit

einem heterozygoten Spender transplantiert wurden. Allgemein gibt es aufgrund der von mir gemachten Beobachtungen keinen Hinweis darauf, dass die Auswahl des Spenders in Bezug auf eine HLA-C-Fehlanpassung, und damit einer Fehlanpassung der KIR-Liganden, zwischen Patient und Spender einen Einfluss auf den klinischen Verlauf nach Transplantation hat. Bei weiteren Berechnungen wurden nur die HLA-C-Allele des Patienten betrachtet. Uhrberg et al. konnten zeigen, dass CML-Patienten ( $n = 108$ ), die homozygot C1/C1 ( $n = 42$ ) waren einen signifikant besseren Überlebensvorteil gegenüber C1/C2 bzw. C2/C2-Patienten hatten (Fischer, Ottinger et al. 2007). Bei den von mir untersuchten Patientenkollektiv zeigte sich bei Betrachtung sämtlicher Leukämieformen ein statistisch knapp nicht signifikanter Überlebensvorteil für C1/C2-Patienten ( $p = 0,06$ ,  $n = 50$ ). C2/C2-Patienten hatten bei dem von mir betrachteten Kollektiv die geringste Überlebenswahrscheinlichkeit. Nach Auftrennung in die Leukämieformen AML und ALL zeigte sich bei AML-Patienten, die homozygot C1/C1 waren, ein knapp nicht signifikanter Überlebensvorteil und bei ALL-Patienten, die C1/C2 waren, ein nicht signifikanter Überlebensvorteil. Die Anwesenheit zumindest eines Allels, das für das C1-Epitop kodiert, scheint damit einen Überlebensvorteil für den Patienten zu haben.

### **2.5 Einfluss der KIR-Haplotypen des Spenders auf das Überleben der Patienten**

Durch die hochauflösende HLA-C- und KIR-Typisierung konnte ich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die KIR-Haplotypen von 72 Spendern und den korrespondierenden Patienten und die jeweiligen HLA-C-Allele bestimmen (C1/C1, C1/C2 oder C2/C2). Der KIR-Haplotyp A/A, also der Haplotyp mit 0 – 1 Genen für aktivierende KIR-Rezeptoren, konnte bei 33% aller Spender und 34% aller Patienten nachgewiesen werden, was mit der Verteilung in der Bevölkerung (30%) laut Literatur korreliert. Unter Verwendung der Überlebensdaten von  $n = 50$  Patienten mit unterschiedlichen Leukämieerkrankungen konnte ich die Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf den KIR-Haplotyp des Spenders statistisch abschätzen. Dabei zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Betrachtung aller Leukämiearten (AML, ALL, NHL usw.) ein statistisch nicht signifikanter Einfluss des KIR-Haplotyps des Spenders auf die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten besteht. So zeigten Patienten ein tendenziell verlängertes Überleben, wenn sie mit Zellen eines Spenders transplantiert wurden, der einen A/A Haplotyp hatte. Bei Aufgliederung in die Leukämieformen AML und ALL zeigte sich zumindest im Fall der ALL-Patienten ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil bei Transplantation mit einem Spender, der einen A/A-KIR-Haplotyp hatte. Da jedoch nur zwei von 13 Patienten einen solchen Spender hatten, muss dieses Ergebnis durch weitere Untersuchungen verifiziert werden.

### **2.6. Einfluss der Anzahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren des Spenders auf das Überleben der Patienten**

Kröger et al. konnten belegen, dass ein statistisch signifikant erhöhtes Risiko für ein Rezidiv bei AML-, MDS- und CML-Patienten vorliegt, die mit einem haploidenten, nicht-verwandten Spender transplantiert wurden, der mehr als 4 aktivierende KIR-Rezeptoren hatte, bzw. homozygot B/B oder heterozygot A/B war (Kroger, Binder et al. 2006). Weiter konnte in dieser Studie belegt werden, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten, die mit einem Spender transplantiert wurden, der mehr als vier aktivierende KIR-Rezeptoren hatte statistisch signifikant schlechter war, als bei Transplantation mit einem Spender, der bis zu drei aktivierende KIR-Rezeptoren hatte. Im Gegensatz zu den von mir erhobenen Daten, zeigte sich bei der Studie von Kröger et al. nur für AML/MDS- und CML-Patienten ein Vorteil bei der Transplantation mit einem Spender, der eine geringe Anzahl an aktivierenden KIR-Rezeptoren hatte, nicht jedoch bei ALL-Patienten. In der von mir untersuchten Patientengruppe zeigten ALL-Patienten einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil bei Transplantation mit einem Spender, der 0 – 1 aktivierenden KIR hatte gegenüber Patienten, die mit Spendermaterial eines Spenders transplantiert wurden, der zwischen 2 – 5 aktivierende KIRs hatte. AML Patienten zeigten in der von mir untersuchten Patientengruppe keinen statistisch signifikanten Einfluss der Anzahl der KIR-Rezeptoren des Spenders auf die Überlebenswahrscheinlichkeit. Die Ergebnisse der Studie von Kröger et al. stehen allerdings in Bezug auf die Rezidivwahrscheinlichkeit und Überlebenswahrscheinlichkeit in Zusammenhang mit der Anzahl an aktivierenden KIR-Rezeptoren des Spenders in Widerspruch zur Hypothese, dass NK-Zellen mit aktivierenden KIR-Rezeptoren putativ alloreaktiv sein können und damit einen GvL-Effekt vermitteln können. Dies wird von Kröger et al. durch eine mögliche Depletion von Dendritischen Zellen des Patienten durch NK-Zellen erklärt, die für die Stimulation zytotoxischer T-Zellen des Spenders im Patienten notwendig sind. Dies würde bedeuten, dass eine große Anzahl aktivierender KIRs auf Spender-NK-Zellen durch die Depletion der Dendritischen Zellen zu einem geringeren, durch alloreaktive T-Zellen vermittelten GvL-Effekt führt (Shah, Gilbertson et al. 1985; Kroger, Binder et al. 2006). Da jedoch NK-Zellen die ersten Lymphozyten sind, die nach einer allogenen Stammzelltransplantation rekonstituiert werden, stellt sich die Frage, ob die putative Alloreaktivität dieser allogenen NK-Zellen sich im Patienten nicht zuerst gegen Leukämiezellen richten würde. Weiterhin sollte, bedingt durch den zeitlichen Abstand der T-Zell-Rekonstitution zumindest ein kurzzeitiger Anstieg von Leukämiezellen zu beobachten sein, falls nur die allogenen zytotoxischen T-Zellen einen GvL-Effekt nach Wechselwirkung mit Dendritischen Zellen des Patienten vermitteln. Da allerdings nur gezeigt die Anzahl der Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren untersucht wurde, kann nicht ausgeschlossen

werden, dass die Oberflächenexpression der aktivierenden Rezeptoren davon abweicht. Ich konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit jedoch belegen, dass im Zusammenhang mit dem Protokoll nach Prof. Dr. Hans-Jochem Kolb eine Depletion KIR-exprimierender NK-Zellen stattfindet. Denkbar wäre, dass im Zuge der Rekonstitution zuerst solche NK-Zellen differenzieren, die KIR-Rezeptoren exprimieren, da das Kompartiment der KIR-negativen NK-Zellen durch transplantierte NK-Zellen des Spenders schon belegt ist. Dies setzt eine fein ausbalancierte Kontrolle des NK-Kompartiments im Sinne der Anzahl an KIR-negativen bzw. KIR-exprimierenden NK-Zellen voraus. Die genauen Abläufe bei der NK-Zellgenese sind zurzeit Gegenstand der Forschung.

### **2.7 Kombination der HLA-C-Allele des Patienten mit den KIR-Genen des Spenders**

Eine weitere Möglichkeit zur Abschätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Leukämiepatienten besteht in der Kombination der HLA-C-Allele des Patienten, also der KIR-Liganden, und des KIR-Haplotyps des Spenders. Nach Aufgliederung in die Leukämieformen AML und ALL zeigte sich bei ALL-Patienten ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil für C1/C2, also in Bezug auf die HLA-C-Allele heterozygote Patienten, die mit einem Spender transplantiert wurden, der einen A/A-KIR-Haplotyp hatte. Bei AML-Patienten zeigte sich hingegen ein Vorteil für C1/C1 homozygote Patienten, die mit einem Spender transplantiert wurden, der entweder einen A/B oder B/B-KIR-Haplotyp hatte. Dies bedeutet, dass unabhängig von der Leukämieform das Vorliegen zumindest eines C1-Allels protektiv für den Patienten wirkt. In Bezug auf den KIR-Haplotypen des Spenders ergeben sich bei den beiden Leukämieformen jedoch Unterschiede. Die von mir gewonnenen Erkenntnisse könnten möglicherweise bei der Auswahl eines geeigneten Spenders hilfreich sein. So wäre für ALL-Patienten, die in Bezug auf die HLA-C-Allele heterozygot sind ein Spender mit KIR-Haplotyp A/A die bestmögliche Kombination. Bei AML-Patienten, die homozygot C1/C1 sind, wäre ein Spender mit KIR-Haplotyp A/B oder B/B die beste Kombination. Die molekularen Zusammenhänge der Wechselwirkung zwischen den HLA-C-Allele und KIR-Haplotypen sind zurzeit jedoch noch völlig unklar.

### **2.8 Einfluss der HLA-C-Gruppen und Anzahl der aktivierenden KIR auf die akute GvHD der Patienten**

Es ist allgemein anerkannt, dass die GvH-Erkrankung von T-Zellen vermittelt wird, die Unterschiede in der Expression von MHC-Antigenen und/oder Minorhistokompatibilitäts-Antigenen erkennen. NK-Zellen spielen bei der GvH-Erkrankung eine eher untergeordnete Rolle. Möglicherweise rekrutieren jedoch T-Zellen Natürlicher Killerzellen, die durch Zytokinsekretion zu einer weiteren Immunantwort beitragen. Eine GvH-Erkrankung wird im Fall der haploidentischen Stammzell- und Knochenmarktransplantation durch die CD6-Depletion von T-Zellen verhindert, bzw. vermindert. Trotz der putativen Alloreaktivität von NK-Zellen in einer haploidentischer Transplantationssituation konnte bisher keine gesteigerte GvH-Erkrankung aufgrund von NK-Zellen nachgewiesen werden (Ruggeri, Capanni et al. 1999). Denkbar wäre jedoch ein positiver Einfluss der alloreaktiven NK-Zellen auf den Verlauf einer GvH-Erkrankung, im Sinne einer Eradikation von Dendritischen Zellen des Empfängers durch Nk-Zellen des Spenders. Die Wechselwirkung von Dendritischen Zellen, die Antigen präsentieren, und Spender T-Zellen könnte zu einer Erkennung von Patienten-Antigenen durch Spender-T-Zellen und somit einer GvHD führen. Im Zuge der vorliegenden Arbeit habe ich den Grad der GvHD mit dem HLA-C-Haplotyp des Patienten und Spenders bzw. der Anzahl an aktivierenden KIRs des Spenders oder Patienten korreliert und gemäß  $\chi^2$ -Test keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl der aktivierenden KIRs oder der HLA-C-Allele finden können. Die Tatsache, dass 37 von 63 Patienten nur eine leichte GvH-Erkrankung (Grad 0 – 1) aufwiesen, ist wahrscheinlich der guten T-Zell-Depletion mittels anti-CD6-Antikörpern geschuldet. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Soiffer et al. überein, die in präklinischen Versuchen nachweisen konnten, dass eine Depletion CD6-positiver Zellen aus dem Transplantat zu einer verminderten GvHD und gleichzeitig zu einem GvL-Effekt führt (Soiffer and Ritz 1993).

### **3. Rekonstitution der peripheren NK-Zellen in den Patienten nach Transplantation**

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte ich die Expression verschiedener NK-Rezeptoren auf rekonstituierten NK-Zellen aus 4 verschiedenen Patienten ca. 6 Monate nach Transplantation untersuchen und mit der Rezeptorexpression auf NK-Zellen des jeweiligen Spenders nach G-CSF-Mobilisierung vergleichen. Dabei konnte ich bei zwei Patienten zeigen, dass die Expression von CD94/NKG2A, also eines inhibierenden NK-Rezeptors, von der Expression inhibierender KIR-Rezeptoren während der Rekonstitution abweicht. Nguyen et al. haben anhand von 8 Patienten, die gemäß dem Protokoll von Ruggeri und Aversa et al. transplantiert wurden, festgestellt, dass eine verstärkte Expression von CD94/NKG2A und

eine verminderte Expression von KIR-Rezeptoren innerhalb der ersten 4 Monate nach der Transplantation zu beobachten ist. Dabei wird die unterschiedliche Expression von KIR-Rezeptoren und des CD94/NKG2A-Rezeptorkomplexes mit Vorgängen bei der NK-Zellentwicklung im Patienten begründet (Nguyen, Dhedin et al. 2005). Die von mir untersuchten Empfänger zeigten sechs Monate nach haploidentischer Transplantation eine Expression von KIR-Rezeptoren, vornehmlich KIR2DL1/CD158a (p58.1) und KIR2DL2/3/CD158b (p58.2), und bei zwei Empfängern auch von p50.3 (KIR2DS4) und p70 (KIR3DL1). Weiter konnte ich feststellen, dass der prozentuale Anteil an NKG2A-positiven NK-Zellen größer war, wenn der Prozentsatz KIR-positiver NK-Zellen gering ausfiel. CD94/NKG2A und die inhibierenden KIR-Rezeptoren dienen funktionell der Vermeidung einer Autoreaktivität der NK-Zellen. Daher scheint es sinnvoll, dass NK-Zellen, die eine geringe Expressionsdichte an inhibierenden KIR-Rezeptoren aufweisen, dies durch eine gesteigerte Expression des inhibierenden Rezeptorkomplexes CD94/NKG2A zu kompensieren. Bei der Untersuchung der Expression von NCRs auf NK-Zellen der Empfänger etwa 6 Monate nach Transplantation konnte ich bei zwei von vier Patienten keine NKp30-Expression beobachten. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Nguyen et al., wobei die fehlende Expression auf einen unreifen Phänotyp der NK-Zellen zurückzuführen ist, da die jeweiligen NK-Zellen der Spender dieser zwei Empfänger NKp30 exprimierten. Bei allen vier von mir untersuchten Patienten konnte nach sechs Monaten eine Expression von NKp46 auf den NK-Zellen beobachtet werden, in Übereinstimmung mit der NKp46-Expression der jeweiligen Spender, wobei bei drei Empfängern der prozentuale Anteil an NKp46<sup>+</sup>-NK-Zellen im Vergleich zum Spender sogar erhöht war. NKp30 und NKp46 werden bei gesunden Personen normalerweise konstitutiv auf ruhenden NK-Zellen exprimiert. Möglicherweise wird die fehlende Expression von NKp30 durch eine verstärkte Expression von NKp46 kompensiert. NKp44, das normalerweise nur nach Induktion durch IL-2 exprimiert wird, konnte bei zwei der Patienten nachgewiesen werden (1% bzw. 10% NKp44-positiv NK-Zellen). Dies deckt sich mit Beobachtungen von Nguyen et al., die bis zu 20% NKp44-positiv NK-Zellen nach Transplantation in Patienten nachweisen konnten (Nguyen, Dhedin et al. 2005). Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte ich die funktionelle Kapazität der rekonstituierten NK-Zellen aufgrund mangelnden Materials nicht untersuchen. Nguyen et al. konnten jedoch zeigen, dass die zytotoxische Aktivität der rekonstituierten NK-Zellen gegenüber HLA-Klasse-defizienten K-562-Zellen und AML-Zellen des Patienten stark eingeschränkt war, was zusammen mit einem ausgeprägten CD56<sup>bright</sup>-Phänotyp darauf schließen lässt, dass NK-Zellen nach bis zu vier Monaten Rekonstitution noch einen unreifen Phänotyp aufweisen und dementsprechend eine geringe Zytotoxizität. Darüber hinaus kann die geringe Zahl an T-Zellen nach Transplantation möglicherweise zu einer verringerten Aktivierung der NK-Zellen durch T-Zellen führen. Das Fehlen von NKp30, der an der

Erkennung von Dendritischen Zellen durch NK-Zellen beteiligt ist (Ferlazzo, Tsang et al. 2002), kann aufgrund einer putativen Beteiligung von Dendritischen Zellen an der Reifung von NK-Zellen ein Grund für den immaturen Phänotyp der Patienten-NKs sein.

Bei einem Vergleich der CD6-Expression auf NK-Zellen zwischen Spender und Patient nach einer Rekonstitution von etwa sechs Monaten konnte ich bei allen Patienten CD6-positive NK-Zellen nachweisen, wobei die Menge an CD6-positiven Zellen bei allen Patienten unterhalb der des jeweiligen Spenders lag. Dies spricht dafür, dass es trotz Transplantation CD6-negativer NK-Zellen zu einer Erholung der CD6-positiven NK-Population im Patienten kommt.

#### 4. Toleranzmodell der haploidentischen Transplantation

Bei der Knochenmark- bzw. hämatopoetischen Stammzelltransplantation spricht man von Immuntoleranz, wenn es zu einer spezifischen Akzeptanz gegenüber einem Transplantat bei gleichzeitiger Reaktivität gegen nicht-verwandte Antigene kommt. Dies bedeutet, dass das Immunsystem nicht auf Antigene des eigenen Organismus oder auf zugeführte Antigene reagiert. Zu den Mechanismen der Erlangung einer Immuntoleranz zählen die Anergie, Ignoranz, Deletion oder Suppression. Die zentrale Tolerisierung der T-Zellen erfolgt durch Deletion, also negativer Selektion, von T-Zellen im Thymus, die ubiquitäre Selbst-Antigene erkennen. Putativ autoreaktive T-Zellen werden somit früh eliminiert. Die Host-versus-Graft-Toleranz erfolgt bei der nicht-myeloablative Knochenmarktransplantation durch zentrale Tolerisierung, wobei Antigen-präsentierende Zellen des Spenders in den Thymus der Empfänger einwandern und dort im Sinne der negativen Selektion Zellen des Empfängers, die gegenüber Spenderzellen reaktiv sind deletieren (Khan, Tomita et al. 1996).

Im umgekehrten Fall, also einer Toleranz in Graft-versus-Host-Richtung können bei gemischten Knochenmarkchimären T-Zellen des Spenders durch Empfänger-APC im Thymus des Empfängers deletiert werden. Bei vollständigen Chimären fehlt die Wechselwirkung zwischen Empfänger-APC und Spender-T-Zellen aufgrund der Myeloablation des Empfängers (Ramsdell, Lantz et al. 1989). Die Toleranz muss in diesem Fall also auf Anergie oder Suppression beruhen. Die Anergie beruht auf einer fehlenden Aktivierung von T-Zellen nach Stimulation durch Antigen. Die aktive Suppression beruht auf der Antigen-spezifischen Inhibition der Immunantwort durch regulatorische T-Zellen, auch T-Suppressorzellen oder *faciliator cells* genannt. Diese aktive spezifische Suppression kann darüber hinaus auf den Empfänger übertragen werden, man spricht von „infektiöser Toleranz“ (Qin, Cobbold et al. 1993; Bemelman, Honey et al. 1998). Als weitere Toleranz-induzierende Zellarten werden DC-2-Zellen, NK-ähnliche T-Zellen und Stroma-Zellen angesehen (Locatelli, Rondelli et al. 2000). Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte die bei der



haploidentischen Knochenmark- und Stammzelltransplantation beobachtete Immuntoleranz untersucht werden. Durch Vorarbeiten von Schumm et al. wurden CD6-negative CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als putative Suppressorzellen identifiziert (Schumm, Gunther et al. 1994). In der Arbeit von Hötzl wurde die Suppressoraktivität CD6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in einem gemischten Lymphozyten-Ansatz nachgewiesen (Hötzl 2006). Dazu wurden Responderzellen eines Spenders mit bestrahlten Stimulatorzellen eines anderen Spenders kokultiviert und die Proliferation der Responderzellen aufgrund Stimulation mittels <sup>3</sup>H-Thymidineinbau nachgewiesen. In einem weiteren Ansatz wurden CD6-depletierte Knochenmarkszellen oder CD6-depletierte PBSC eines weiteren Spenders zusammen mit den Responder- und Stimulatorzellen kokultiviert und der <sup>3</sup>H-Thymidineinbau bestimmt. Der Vergleich der beiden Ansätze zeigte einen Rückgang des <sup>3</sup>H-Thymidineinbaus (also der Proliferation) nach Zugabe von CD6-depletiertem Knochenmark bzw. CD6-depletiertem PBSC. Dieser Rückgang der Proliferation wurde der suppressiven Wirkung von Zellen aus dem CD6-depletierten Knochenmark/PBSC zugeschrieben. In einem weiteren Versuch wurden isolierte CD6-negative CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als Suppressorzellen eingesetzt und ein Rückgang des <sup>3</sup>H-Thymidineinbaus beobachtet. Bei Betrachtung der Ergebnisse ist jedoch darauf hinzuweisen, dass es sich in allen Experimenten um eine Allo-Situation handelt, da Responderzellen, Stimulatorzellen und Suppressorzellen aus drei verschiedenen Individuen stammten. Um ein genaueres Abbild der Situation bei einer haploidentischen Transplantation zu erhalten, sollten im Zuge dieser Arbeit Toleranzexperimente mit Responderzellen aus dem Spender, Stimulatorzellen aus dem entsprechenden Patienten und Suppressorzellen aus dem gleichen Spender durchgeführt werden. Ich konnte eine solche „Haplo-Situation“ zweimal experimentell untersuchen. Bei vier weiteren Toleranzexperimenten musste ich aufgrund fehlenden Patientenmaterials auf allo-PBL als Stimulatorzellen zurückgreifen. Weiter sollte der Einfluss der Suppressorzellen auf die Proliferation der Responderzellen in der vorliegenden Arbeit durch einen CFSE-Proliferationsassay erfolgen. Durch diese Vorgehensweise konnte sogar zwischen der Proliferation von NK- bzw. T-Zellen innerhalb der Responderzellpopulation unterschieden werden. Der CFSE-Proliferationsassay basiert auf der Abnahme der CFSE-Färbung durch die Teilung von Zellen und gleichmäßige Verteilung des fluoreszierenden Farbstoffs auf die Tochterzellen. Proliferierende Zellen besitzen somit nach mehreren Tagen (5 Tage) einen CFSE<sup>low</sup>-Phänotyp, der sich mittels FACS-Analyse nachweisen lässt. Um auszuschließen, dass zugegebene Suppressorzellen nicht mit CFSE<sup>low</sup>-Responderzellen, also proliferierenden Zellen, verwechselt werden konnten, wurden bei einigen Versuchen die Suppressorzellen mit einem Farbstoff gefärbt, der sich von CFSE unterscheiden lässt. Ich konnte bei zwei von sechs Versuchen nach Zugabe von Suppressorzellen eine eindeutig verringerte Proliferation von NK- und T-Zellen nachweisen, im Vergleich zum Ansatz ohne Suppressorzellen. Bei den anderen Versuchen

war möglicherweise aufgrund der schlechten Qualität der Responderzellen nach Leukapharese und CFSE-Färbung sowie Koinkubation für 5 Tage mit Stimulatorzellen keine Proliferation nach Stimulus zu beobachten und dementsprechend auch keine Suppression der Proliferation möglich. Bei einem Versuch wurde parallel der  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau nach Stimulation und Zugabe von Suppressorzellen bestimmt. Dabei konnte im  $^3\text{H}$ -Thymidineinbauversuch eine Suppression nachgewiesen werden, nicht jedoch im CFSE-Proliferationsassay. Die beiden Versuchssysteme sind somit möglicherweise nicht miteinander vergleichbar. Allein schon aufgrund der Tatsache, dass trotz geringer Bestrahlung der Suppressorzellen ein  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau in diese Zellen nicht ausgeschlossen werden kann. Ich konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit auch keine isolierten CD6-negativen CD8-positiven T-Zellen als Responderzellen aufgrund zu geringer Zellzahlen der Suppressorzellfraktion für eine CD8-Isolation einsetzen. In einem weiteren Versuch konnte ich die Suppressorzellen mittels permeabler Membraneinsätze räumlich von den Responderzellen trennen, um eine mögliche Suppression über Zytokine (z.B. IL-10) nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Bei diesen Versuchen zeigte sich jedoch keine Beeinflussung der Proliferation der Responderzellen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Nachweis einer möglichen Immunsuppression über Zellen aus dem Stammzellpräparat bzw. CD6-depletierten Stammzellpräparat mittels CFSE-Proliferationsassay schwierig ist, weil die verschiedenen Zellarten in einer gemischten Lymphozytenpopulation sich gegenseitig beeinflussen können. Um die suppressive Wirkung einer spezifischen Zellart zu bestimmen, muss diese möglichst rein vorliegen und sich eine spezifische Wirkung der Suppressorzellpopulation im Vergleich zu einem Ansatz ohne Suppressorzellen wiederholt nachweisen lassen. Gleichzeitig muss unbedingt darauf geachtet werden, dass das in vitro-Versuchssystem nur eine Alloreaktivität der Responderzellen gegenüber den Stimulatorzellen vorsieht. Falls die Suppressorpopulation von einem weiteren fremden Spender stammt, kann es putativ zu einer Alloreaktion zwischen den Responderzellen und den Suppressorzellen kommen. Anhand der von mir durchgeführten Versuche im Bezug auf die Immuntoleranz konnte ich zumindest eine technische Grundlage für die Verwendung der CFSE-Färbung und der FACS-Analyse bei der gemischten Lymphozyten-Reaktion zur Bestimmung der Immunsuppression bei der haploidentischen Knochenmark- und Stammzelltransplantation schaffen. Bei zukünftigen Arbeiten in Hinblick auf die Immunsuppression sollte bei einem freiwilligen Spender eine G-CSF-Mobilisierung durchgeführt werden, um ausreichend Material zur Verfügung zu haben, das nicht für die Behandlung eines Patienten bestimmt ist. Darüber hinaus müsste Spendermaterial für die Stimulatorzellen asserviert werden, das in Bezug auf die HLA-Ausstattung haploidentisch ist. Anschließende könnten durch eine CD6-Depletion des PBSC-Präparats eine ausreichende Zellzahl zur anschließenden Isolation CD6<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen

oder anderer putativ suppressiv wirkender Zellarten gewonnen werden. Für die nicht-radioaktive Untersuchung der Proliferation der Responderzellen und Wirkung der Suppressorzellen auf die Proliferation der Responderzellen steht durch die vorliegende Arbeit ein etabliertes Protokoll zur Verfügung.

## G. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberola-Ila, J., K. A. Hogquist, et al. (1996). "Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways." J Exp Med **184**(1): 9-18.
- Alter, G., J. M. Malenfant, et al. (2004). "CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity." J Immunol Methods **294**(1-2): 15-22.
- Anasetti, C., D. Amos, et al. (1989). "Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma." N Engl J Med **320**(4): 197-204.
- Andre, P., R. Biassoni, et al. (2001). "New nomenclature for MHC receptors." Nat Immunol **2**(8): 661.
- Andrin, C., M. J. Pinkoski, et al. (1998). "Interaction between a Ca<sup>2+</sup>-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules." Biochemistry **37**(29): 10386-94.
- Anfossi, N., P. Andre, et al. (2006). "Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I." Immunity **25**(2): 331-42.
- Aoukaty, A. and R. Tan (2005). "Role for glycogen synthase kinase-3 in NK cell cytotoxicity and X-linked lymphoproliferative disease." J Immunol **174**(8): 4551-8.
- Arnon, T. I., H. Achdout, et al. (2005). "Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus." Nat Immunol **6**(5): 515-23.
- Arnon, T. I., H. Achdout, et al. (2004). "The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46." Blood **103**(2): 664-72.
- Bacon, L., R. A. Eagle, et al. (2004). "Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D." J Immunol **173**(2): 1078-84.
- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1994). "Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines." Adv Immunol **55**: 97-179.
- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.
- Batoni, G., S. Esin, et al. (2005). "Human CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets respond differentially to direct stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin." Scand J Immunol **62**(6): 498-506.
- Bauer, S., V. Groh, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science **285**(5428): 727-9.
- Becker, S., R. Kiessling, et al. (1978). "Modulation of sensitivity to natural killer cell lysis after in vitro explantation of a mouse lymphoma." J Natl Cancer Inst **61**(6): 1495-8.
- Beelen, D. W., H. D. Ottinger, et al. (2005). "Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias." Blood **105**(6): 2594-600.

- Bemelman, F., K. Honey, et al. (1998). "Bone marrow transplantation induces either clonal deletion or infectious tolerance depending on the dose." J Immunol **160**(6): 2645-8.
- Bethge, W. A., M. Haegeler, et al. (2006). "Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: fast engraftment and low toxicity." Exp Hematol **34**(12): 1746-52.
- Betts, M. R., J. M. Brechley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." J Immunol Methods **281**(1-2): 65-78.
- Biassoni, R., M. Falco, et al. (1995). "Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones." J.Exp.Med. **182**(2): 605-609.
- Biassoni, R., A. Pessino, et al. (1997). "Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules." Eur J Immunol **27**(12): 3095-9.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, et al. (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol **17**: 189-220.
- Bix, M., N. S. Liao, et al. (1991). "Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice." Nature **349**(6307): 329-31.
- Blery, M., L. Olcese, et al. (2000). "Early signaling via inhibitory and activating NK receptors." Hum Immunol **61**(1): 51-64.
- Bonnema, J. D., L. M. Karnitz, et al. (1994). "Fc receptor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase in natural killer cells is associated with protein kinase C-independent granule release and cell-mediated cytotoxicity." J Exp Med **180**(4): 1427-35.
- Bordignon, C., C. Carlo-Stella, et al. (1999). "Cell therapy: achievements and perspectives." Haematologica **84**(12): 1110-49.
- Bornhauser, M., R. Schwerdtfeger, et al. (2004). "Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors." Blood **103**(7): 2860-1; author reply 2862.
- Bossi, G. and G. M. Griffiths (1999). "Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells." Nat Med **5**(1): 90-6.
- Bossi, G. and G. M. Griffiths (2005). "CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle." Semin Immunol **17**(1): 87-94.
- Bottino, C., R. Castriconi, et al. (2005). "Cellular ligands of activating NK receptors." Trends Immunol **26**(4): 221-6.
- Bouchon, A., C. Hernandez-Munain, et al. (2001). "A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells." J Exp Med **194**(8): 1111-22.

- Boyington, J. C. and P. D. Sun (2002). "A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors." Mol Immunol **38**(14): 1007-21.
- Braud, V. M., D. S. Allan, et al. (1998). "HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C." Nature **391**(6669): 795-9.
- Brown, M. H., K. Boles, et al. (1998). "2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48." J Exp Med **188**(11): 2083-90.
- Bryceson, Y. T., M. E. March, et al. (2005). "Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells." J Exp Med **202**(7): 1001-12.
- Bryceson, Y. T., M. E. March, et al. (2006). "Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells." Immunol Rev **214**: 73-91.
- Bryceson, Y. T., M. E. March, et al. (2006). "Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion." Blood **107**(1): 159-66.
- Caligiuri, M. A., A. Velardi, et al. (2004). "Immunotherapeutic approaches for hematologic malignancies." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 337-53.
- Caligiuri, M. A., A. Zmuidzinas, et al. (1990). "Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors." J Exp Med **171**(5): 1509-26.
- Cantoni, C., C. Bottino, et al. (1999). "NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily." J Exp Med **189**(5): 787-96.
- Carrington, M. and M. Cullen (2004). "Justified chauvinism: advances in defining meiotic recombination through sperm typing." Trends Genet **20**(4): 196-205.
- Carrington, M. and M. P. Martin (2006). "The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease." Curr Top Microbiol Immunol **298**: 225-57.
- Carson, W. E., M. E. Ross, et al. (1995). "Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro." J Clin Invest **96**(6): 2578-82.
- Cella, M., A. Longo, et al. (1994). "NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80." J Exp Med **180**(4): 1235-42.
- Cerwenka, A., J. L. Baron, et al. (2001). "Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11521-6.
- Cerwenka, A. and L. L. Lanier (2003). "NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer." Tissue Antigens **61**(5): 335-43.
- Chalupny, N. J., C. L. Sutherland, et al. (2003). "ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D." Biochem Biophys Res Commun **305**(1): 129-35.

- Chapman, T. L., A. P. Heikeman, et al. (1999). "The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18." Immunity **11**(5): 603-13.
- Chen, R., F. Relouzat, et al. (2004). "Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors." Mol Cell Biol **24**(12): 5144-56.
- Chini, C. C., M. D. Boos, et al. (2000). "Regulation of p38 mitogen-activated protein kinase during NK cell activation." Eur J Immunol **30**(10): 2791-8.
- Chuang, S. S., M. H. Kim, et al. (2000). "2B4 stimulation of YT cells induces natural killer cell cytolytic function and invasiveness." Immunology **100**(3): 378-83.
- Chuang, S. S., J. K. Lee, et al. (2003). "Protein kinase C is involved in 2B4 (CD244)-mediated cytotoxicity and AP-1 activation in natural killer cells." Immunology **109**(3): 432-9.
- Colonna, M., G. Borsellino, et al. (1993). "HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 12000-4.
- Colucci, F., M. A. Caligiuri, et al. (2003). "What does it take to make a natural killer?" Nat Rev Immunol **3**(5): 413-25.
- Cook, M. A., D. W. Milligan, et al. (2004). "The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia." Blood **103**(4): 1521-6.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends Immunol **22**(11): 633-40.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends Immunol. **22**(11): 633-640.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset." Blood **97**(10): 3146-51.
- Copelan, E. A. (2006). "Hematopoietic stem-cell transplantation." N Engl J Med **354**(17): 1813-26.
- Correa, I., L. Corral, et al. (1994). "Multiple natural killer cell-activating signals are inhibited by major histocompatibility complex class I expression in target cells." Eur J Immunol **24**(6): 1323-31.
- Cosman, D., J. Mullberg, et al. (2001). "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor." Immunity **14**(2): 123-33.
- Cosman; David J., M. J., Fanslow, III; William C., Kubin; Marek, Armitage; Richard Jeffrey (2007). ULBP antibodies. US.
- Das, H., V. Groh, et al. (2001). "MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function." Immunity **15**(1): 83-93.

- Davies, S. M., L. Ruggieri, et al. (2002). "Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor." Blood **100**(10): 3825-3827.
- Davies, S. M., L. Ruggieri, et al. (2002). "Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor." Blood **100**(10): 3825-7.
- Davis, D. M. (2002). "Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells." Trends Immunol **23**(7): 356-63.
- Di Santo, J. P. and C. A. Vosshenrich (2006). "Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development." Immunol Rev **214**: 35-46.
- Diefenbach, A., A. M. Jamieson, et al. (2000). "Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages." Nat Immunol **1**(2): 119-26.
- Diefenbach, A., E. R. Jensen, et al. (2001). "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." Nature **413**(6852): 165-71.
- Dorfman, J. R., J. Zerrahn, et al. (1997). "The basis for self-tolerance of natural killer cells in beta2-microglobulin- and TAP-1- mice." J Immunol **159**(11): 5219-25.
- Dorman, S. E., C. Picard, et al. (2004). "Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies." Lancet **364**(9451): 2113-21.
- Dunlop, M. B., P. C. Doherty, et al. (1977). "Cytotoxic T cell response to lymphocytic choriomeningitis virus. Properties of precursors of effector T cells, primary effector T cells and memory T cells in vitro and in vivo." Immunology **33**(3): 361-8.
- Durek, C., I. Schafer, et al. (1997). "Effects of colony-stimulating factors on cellular cytotoxicity." Cancer Immunol Immunother **44**(1): 35-40.
- Eissmann, P., L. Beauchamp, et al. (2005). "Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244)." Blood **105**(12): 4722-9.
- Ellis, S. A., I. L. Sargent, et al. (1986). "Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line." Immunology **59**(4): 595-601.
- Emilie, D., J. Wijdenes, et al. (1994). "Administration of an anti-interleukin-6 monoclonal antibody to patients with acquired immunodeficiency syndrome and lymphoma: effect on lymphoma growth and on B clinical symptoms." Blood **84**(8): 2472-9.
- Estensen, R. D. (1984). "Phorbol myristate acetate: is a tumor promoter acting as a hormone?" J Exp Pathol **1**(2): 71-7.
- Fan, Q. R., L. Mosyak, et al. (1999). "Structure of a human natural killer cell inhibitory receptor." Transplant Proc **31**(4): 1871-2.
- Fanger, N. A., D. Cosman, et al. (1998). "The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes." Eur J Immunol **28**(11): 3423-34.
- Faroudi, M., C. Utzny, et al. (2003). "Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14145-50.



- Fehniger, T. A., M. A. Cooper, et al. (2003). "CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity." Blood **101**(8): 3052-7.
- Fehniger, T. A., M. H. Shah, et al. (1999). "Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response." J Immunol **162**(8): 4511-20.
- Ferlazzo, G., M. L. Tsang, et al. (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells." J Exp Med **195**(3): 343-51.
- Fernandez, N. C., E. Treiner, et al. (2005). "A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules." Blood **105**(11): 4416-23.
- Fischer, J. C., H. Ottinger, et al. (2007). "Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor." J Immunol **178**(6): 3918-23.
- Flaig, R. M., S. Stark, et al. (2004). "Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction." J Immunol **172**(11): 6524-7.
- Freud, A. G. and M. A. Caligiuri (2006). "Human natural killer cell development." Immunol Rev **214**: 56-72.
- Freud, A. G., A. Yokohama, et al. (2006). "Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo." J Exp Med **203**(4): 1033-43.
- Fuchs, A., M. Cella, et al. (2005). "Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44." Blood **106**(6): 2076-82.
- Fukushima, Y., Y. Oshika, et al. (1998). "Increased expression of human histocompatibility leukocyte antigen-G in colorectal cancer cells." Int J Mol Med **2**(3): 349-351.
- Gagne, K., G. Brizard, et al. (2002). "Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome." Hum Immunol **63**(4): 271-80.
- Gao, N., P. Schwartzberg, et al. (2006). "B cell induction of IL-13 expression in NK cells: role of CD244 and SLAM-associated protein." J Immunol **176**(5): 2758-64.
- Germain, R. N. (1986). "Immunology. The ins and outs of antigen processing and presentation." Nature **322**(6081): 687-9.
- Giebel, S., F. Locatelli, et al. (2003). "Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors." Blood **102**(3): 814-819.
- Gimferrer, I., M. Calvo, et al. (2004). "Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation." J Immunol **173**(4): 2262-70.
- Gimferrer, I., A. Ibanez, et al. (2005). "The lymphocyte receptor CD6 interacts with syntenin-1, a scaffolding protein containing PDZ domains." J Immunol **175**(3): 1406-14.
- Goulmy, E. (1997). "Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy." Immunol Rev **157**: 125-40.

- Goulmy, E., R. Schipper, et al. (1996). "Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation." N Engl J Med **334**(5): 281-5.
- Groh, V., R. Rhinehart, et al. (2001). "Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells." Nat Immunol **2**(3): 255-60.
- Grzywacz, B., N. Kataria, et al. (2006). "Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells." Blood **108**(12): 3824-33.
- Gumperz, J. E., V. Litwin, et al. (1995). "The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor." J Exp Med **181**(3): 1133-44.
- Hamerman, J. A. and L. L. Lanier (2006). "Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors." Sci STKE **2006**(320): re1.
- Hanaoka, N., T. Kawaguchi, et al. (2006). "Immunoselection by natural killer cells of PIGA mutant cells missing stress-inducible ULBP." Blood **107**(3): 1184-91.
- Hansasuta, P., T. Dong, et al. (2004). "Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific." Eur J Immunol **34**(6): 1673-9.
- Hassan, N. J., A. N. Barclay, et al. (2004). "Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166." Eur J Immunol **34**(4): 930-40.
- Ho, E. L., L. N. Carayannopoulos, et al. (2002). "Costimulation of multiple NK cell activation receptors by NKG2D." J Immunol **169**(7): 3667-75.
- Hoglund, P., C. Ohlen, et al. (1991). "Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10332-6.
- Hoshino, T., R. T. Winkler-Pickett, et al. (1999). "IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN-gamma." J Immunol **162**(1): 51-9.
- Houlihan, J. M., P. A. Biro, et al. (1995). "The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G." J Immunol **154**(11): 5665-74.
- Hsu, K. C., X. R. Liu, et al. (2002). "Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets." J Immunol **169**(9): 5118-29.
- Hötzl, F. (2006). Charakterisierung von CD6-negativen Suppressorzellen im Knochenmark und in G-CSF-mobilisierten Blutzellen. Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
- Ibrahim, E. C., N. Guerra, et al. (2001). "Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma." Cancer Res **61**(18): 6838-45.
- Jacobs, R., G. Hintzen, et al. (2001). "CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells." Eur J Immunol **31**(10): 3121-7.

- Janeway, C. A., Jr. and P. Travers (2004). Immunobiology V. The Immune system, Lippincott Publishers. **V**.
- Kalwak, K., I. Moson, et al. (2003). "A prospective analysis of immune recovery in children following allogeneic transplantation of t-cell-depleted or non-T-cell-depleted hematopoietic cells from HLA-disparate family donors." Transplant Proc **35**(4): 1551-5.
- Karnitz, L. M. and R. T. Abraham (1996). "Interleukin-2 receptor signaling mechanisms." Adv Immunol **61**: 147-99.
- Karre, K. (2002). "NK cells, MHC class I molecules and the missing self." Scand.J.Immunol. **55**(3): 221-228.
- Karre, K., H. G. Ljunggren, et al. (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-8.
- Katz, G., R. Gazit, et al. (2004). "MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4." J Immunol **173**(3): 1819-25.
- Katz, G., G. Markel, et al. (2001). "Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4." J Immunol **166**(12): 7260-7.
- Khakoo, S. I. and M. Carrington (2006). "KIR and disease: a model system or system of models?" Immunol Rev **214**: 186-201.
- Khan, A., Y. Tomita, et al. (1996). "Thymic dependence of loss of tolerance in mixed allogeneic bone marrow chimeras after depletion of donor antigen. Peripheral mechanisms do not contribute to maintenance of tolerance." Transplantation **62**(3): 380-7.
- Kim, S., Y. J. Song, et al. (2006). "Arrested natural killer cell development associated with transgene insertion into the Atf2 locus." Blood **107**(3): 1024-30.
- Kobayashi, M., L. Fitz, et al. (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." J Exp Med **170**(3): 827-45.
- Kolb, H. J., W. Günther, et al. (2006). Use of Stem Cells and CD6-Depleted Stem Cells for inducing Tolerance of allogenic Transplants and/or for Treating Leukemia EP1370641.
- Kolb, H. J., C. Schmid, et al. (2004). "Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras." Blood **103**(3): 767-76.
- Kolb, H. J., C. Schmid, et al. (2002). "Cytoreduction, DLI, or mobilized peripheral blood progenitors." Ann.Hematol. **81 Suppl 2**: S30-S33.
- Koopman, L. A., H. D. Kopcow, et al. (2003). "Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential." J Exp Med **198**(8): 1201-12.
- Kovats, S., E. K. Main, et al. (1990). "A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts." Science **248**(4952): 220-3.

- Krahenbuhl, O. and J. Tschopp (1991). "Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation." Immunol Today **12**(11): 399-402; discussion 403.
- Kroger, N., T. Binder, et al. (2006). "Low number of donor activating killer immunoglobulin-like receptors (KIR) genes but not KIR-ligand mismatch prevents relapse and improves disease-free survival in leukemia patients after in vivo T-cell depleted unrelated stem cell transplantation." Transplantation **82**(8): 1024-30.
- Kubin, M., L. Cassiano, et al. (2001). "ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells." Eur J Immunol **31**(5): 1428-37.
- Lamb, L. S., Jr., A. P. Gee, et al. (1998). "Phenotypic and functional reconstitution of peripheral blood lymphocytes following T cell-depleted bone marrow transplantation from partially mismatched related donors." Bone Marrow Transplant **21**(5): 461-71.
- Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." Annu Rev Immunol **16**: 359-93.
- Lanier, L. L. (2003). "Natural killer cell receptor signaling." Curr Opin Immunol **15**(3): 308-314.
- Lanier, L. L. (2003). "Natural killer cell receptor signaling." Curr Opin Immunol **15**(3): 308-14.
- Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." Annu Rev Immunol **23**: 225-74.
- Lanier, L. L., C. Chang, et al. (1991). "Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56)." J Immunol **146**(12): 4421-6.
- Lassailly, F., I. Sielleur, et al. (2005). "rhG-CSF does not affect the phenotype of adult donor peripheral blood NK cells." Bone Marrow Transplant **35**(1): 25-32.
- Le Bouteiller, P. and A. Blaschitz (1999). "The functionality of HLA-G is emerging." Immunol Rev **167**: 233-44.
- Lee, K. M., J. P. Forman, et al. (2006). "Requirement of homotypic NK-cell interactions through 2B4(CD244)/CD48 in the generation of NK effector functions." Blood **107**(8): 3181-8.
- Lefebvre, S., M. Antoine, et al. (2002). "Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer." J Pathol **196**(3): 266-74.
- Leiden, J. M., B. A. Karpinski, et al. (1989). "Susceptibility to natural killer cell-mediated cytotoxicity is independent of the level of target cell class I HLA expression." J Immunol **142**(6): 2140-7.
- Leonard, W. J. and J. J. O'Shea (1998). "Jaks and STATs: biological implications." Annu Rev Immunol **16**: 293-322.
- Liao, N. S., M. Bix, et al. (1991). "MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity." Science **253**(5016): 199-202.

- Litwin, V., J. Gumperz, et al. (1993). "Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non-self alleles, and influence of the target cell type." J Exp Med **178**(4): 1321-36.
- Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol.Today **11**(7): 237-244.
- Locatelli, F., D. Rondelli, et al. (2000). "Tolerance and hematopoietic stem cell transplantation 50 years after Burnet's theory." Exp Hematol **28**(5): 479-89.
- Long, E. O. (1999). "Regulation of immune responses through inhibitory receptors." Annu Rev Immunol **17**: 875-904.
- Long, E. O. (1999). "Regulation of immune responses through inhibitory receptors." Annu.Rev.Immunol. **17**: 875-904.
- Lopez-Botet, M. and T. Bellon (1999). "Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I." Curr Opin Immunol **11**(3): 301-7.
- Lowe, E. J., V. Turner, et al. (2003). "T-cell alloreactivity dominates natural killer cell alloreactivity in minimally T-cell-depleted HLA-non-identical paediatric bone marrow transplantation." Br J Haematol **123**(2): 323-6.
- Mainiero, F., A. Gismondi, et al. (1998). "Integrin-mediated ras-extracellular regulated kinase (ERK) signaling regulates interferon gamma production in human natural killer cells." J Exp Med **188**(7): 1267-75.
- Mandelboim, O., N. Lieberman, et al. (2001). "Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells." Nature **409**(6823): 1055-60.
- Marsh, S. G., P. Parham, et al. (2003). "Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002." Tissue Antigens **62**(1): 79-86.
- Martin, M. P., A. Bashirova, et al. (2003). "Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over." J Immunol **171**(5): 2192-5.
- Maxwell, L. D., A. Wallace, et al. (2002). "A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey." Tissue Antigens **60**(3): 254-8.
- McVicar, D. W., L. S. Taylor, et al. (1998). "DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase." J Biol Chem **273**(49): 32934-42.
- Menier, C., B. Riteau, et al. (2002). "MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal." Int J Cancer **100**(1): 63-70.
- Milella, M., A. Gismondi, et al. (1997). "CD16 cross-linking induces both secretory and extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent cytosolic phospholipase A2 (PLA2) activity in human natural killer cells: involvement of ERK, but not PLA2, in CD16-triggered granule exocytosis." J Immunol **158**(7): 3148-54.
- Miller, J. S., F. Prosper, et al. (1997). "Natural killer (NK) cells are functionally abnormal and NK cell progenitors are diminished in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cell collections." Blood **90**(8): 3098-105.

- Mizutani, K., P. Terasaki, et al. (2005). "Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure." Am J Transplant **5**(9): 2265-72.
- Moretta, A. (2002). "Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues." Nat Rev Immunol **2**(12): 957-64.
- Moretta, A., R. Biassoni, et al. (2000). "Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity." Immunol.Today **21**(5): 228-234.
- Moretta, A., C. Bottino, et al. (1996). "Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells." Annu Rev Immunol **14**: 619-48.
- Moretta, A., C. Bottino, et al. (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." Annu.Rev.Immunol. **19**: 197-223.
- Moretta, A., C. Bottino, et al. (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." Annu Rev Immunol **19**: 197-223.
- Moretta, A., S. Sivori, et al. (1995). "Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells." J.Exp.Med. **182**(3): 875-884.
- Moretta, A., M. Vitale, et al. (1993). "P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities." J.Exp.Med. **178**(2): 597-604.
- Moretta, L., R. Biassoni, et al. (2002). "Human NK cells and their receptors." Microbes.Infect. **4**(15): 1539-1544.
- Moretta, L., R. Biassoni, et al. (2000). "Human NK-cell receptors." Immunol.Today **21**(9): 420-422.
- Moretta, L., E. Ciccone, et al. (1992). "Human natural killer cells: clonally distributed specific functions and triggering surface molecules." Lab Invest **66**(2): 138-142.
- Moretta, L., E. Ciccone, et al. (1994). "Origin and functions of human natural killer cells." Int J Clin Lab Res **24**(4): 181-6.
- Moretta, L., M. C. Mingari, et al. (1996). "The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function." J Clin Immunol **16**(5): 243-53.
- Moretta, L. and A. Moretta (2004). "Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors." Embo J **23**(2): 255-9.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-65.
- Nagler, A., L. L. Lanier, et al. (1989). "Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells." J Immunol **143**(10): 3183-91.
- Nagler, A., L. L. Lanier, et al. (1990). "Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo." J Exp Med **171**(5): 1527-33.
- Nguyen, S., N. Dhedin, et al. (2005). "NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect." Blood **105**(10): 4135-42.

- Nishimura, M. I., I. Stroynowski, et al. (1988). "H-2Kb antigen expression has no effect on natural killer susceptibility and tumorigenicity of a murine hepatoma." J Immunol **141**(12): 4403-9.
- Novelli, F. and J. L. Casanova (2004). "The role of IL-12, IL-23 and IFN-gamma in immunity to viruses." Cytokine Growth Factor Rev **15**(5): 367-77.
- Nowbakht, P., M. C. Ionescu, et al. (2005). "Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias." Blood **105**(9): 3615-22.
- O'Connor, G. M., K. J. Guinan, et al. (2007). "Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells." J Immunol **178**(1): 235-41.
- O'Shea, J. J., A. Ma, et al. (2002). "Cytokines and autoimmunity." Nat Rev Immunol **2**(1): 37-45.
- Ouwens, D. M., N. D. de Ruiter, et al. (2002). "Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38." Embo J **21**(14): 3782-93.
- Papamichail, M., S. A. Perez, et al. (2004). "Natural killer lymphocytes: biology, development, and function." Cancer Immunol Immunother **53**(3): 176-86.
- Parham, P. (2006). "Taking license with natural killer cell maturation and repertoire development." Immunol Rev **214**: 155-60.
- Paul, P., N. Rouas-Freiss, et al. (1998). "HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4510-5.
- Pena, J., C. Alonso, et al. (1990). "Natural killer susceptibility is independent of HLA class I antigen expression on cell lines obtained from human solid tumors." Eur J Immunol **20**(11): 2445-8.
- Penack, O., C. Gentilini, et al. (2005). "CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets." Leukemia **19**(5): 835-40.
- Pende, D., R. Biassoni, et al. (1996). "The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer." J Exp Med **184**(2): 505-18.
- Pende, D., S. Parolini, et al. (1999). "Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells." J Exp Med **190**(10): 1505-16.
- Pende, D., G. M. Spaggiari, et al. (2005). "Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112)." Blood **105**(5): 2066-73.
- Perussia, B. (1998). "Fc receptors on natural killer cells." Curr Top Microbiol Immunol **230**: 63-88.

- Pessino, A., S. Sivori, et al. (1998). "Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity." J Exp Med **188**(5): 953-60.
- Peter, I., M. Nawrath, et al. (2002). "Immunotherapy for murine K1735 melanoma: combinatorial use of recombinant adenovirus expressing CD40L and other immunomodulators." Cancer Gene Ther **9**(7): 597-605.
- Peters, P. J., J. Borst, et al. (1991). "Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes." J Exp Med **173**(5): 1099-109.
- Poggi, A., A. M. Massaro, et al. (2005). "Tumor-induced apoptosis of human IL-2-activated NK cells: role of natural cytotoxicity receptors." J Immunol **174**(5): 2653-60.
- Poggi, A., C. Venturino, et al. (2004). "Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid." Cancer Res **64**(24): 9172-9.
- Qin, S., S. P. Cobbold, et al. (1993). "'Infectious' transplantation tolerance." Science **259**(5097): 974-7.
- Rajagopalan, S., Y. T. Bryceson, et al. (2006). "Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G." PLoS Biol **4**(1): e9.
- Rajagopalan, S. and E. O. Long (1999). "A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells." J Exp Med **189**(7): 1093-100.
- Rammensee, H. G. (1995). "Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules." Curr Opin Immunol **7**(1): 85-96.
- Ramsdell, F., T. Lantz, et al. (1989). "A nondeletional mechanism of thymic self tolerance." Science **246**(4933): 1038-41.
- Raulet, D. H. (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." Nat Rev Immunol **3**(10): 781-90.
- Raulet, D. H. (2006). "Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells." Semin Immunol **18**(3): 145-50.
- Raulet, D. H. and R. E. Vance (2006). "Self-tolerance of natural killer cells." Nat Rev Immunol **6**(7): 520-31.
- Raulet, D. H., R. E. Vance, et al. (2001). "Regulation of the natural killer cell receptor repertoire." Annu Rev Immunol **19**: 291-330.
- Ravetch, J. V. and L. L. Lanier (2000). "Immune inhibitory receptors." Science **290**(5489): 84-9.
- Reinherz, E. L., R. Geha, et al. (1982). "Reconstitution after transplantation with T-lymphocyte-depleted HLA haplotype-mismatched bone marrow for severe combined immunodeficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(19): 6047-51.
- Robertson, M. J. (2002). "Role of chemokines in the biology of natural killer cells." J Leukoc Biol **71**(2): 173-83.



- Robertson, M. J., R. J. Soiffer, et al. (1992). "Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF." J Exp Med **175**(3): 779-88.
- Rock, K. L., I. A. York, et al. (2002). "Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides." Adv Immunol **80**: 1-70.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-28.
- Rosenberg, S. (1985). "Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer." J Natl Cancer Inst **75**(4): 595-603.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, et al. (1985). "Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer." N Engl J Med **313**(23): 1485-92.
- Rosmaraki, E. E., I. Douagi, et al. (2001). "Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow." Eur J Immunol **31**(6): 1900-9.
- Roth, C., J. R. Carlyle, et al. (2000). "Clonal acquisition of inhibitory Ly49 receptors on developing NK cells is successively restricted and regulated by stromal class I MHC." Immunity **13**(1): 143-53.
- Ruggeri, L., F. Aversa, et al. (2006). "Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self." Immunol Rev **214**: 202-18.
- Ruggeri, L., M. Capanni, et al. (1999). "Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation." Blood **94**(1): 333-9.
- Ruggeri, L., M. Capanni, et al. (2005). "The impact of donor natural killer cell alloreactivity on allogeneic hematopoietic transplantation." Transpl Immunol **14**(3-4): 203-6.
- Ruggeri, L., M. Capanni, et al. (2005). "Natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation." Int J Hematol **81**(1): 13-7.
- Ruggeri, L., M. Capanni, et al. (2002). "Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants." Science **295**(5562): 2097-2100.
- Ruggeri, L., A. Mancusi, et al. (2006). "Natural killer cell recognition of missing self and haploidentical hematopoietic transplantation." Semin Cancer Biol **16**(5): 404-11.
- Ruggeri, L., A. Mancusi, et al. (2005). "Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy." J Immunother **28**(3): 175-82.
- Sachs, L. and J. Lotem (1993). "Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy." Blood **82**(1): 15-21.
- Saito, S., T. Kasahara, et al. (1994). "Interleukin-8 production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua." Biochem Biophys Res Commun **200**(1): 378-83.
- Samson, S. I., S. Memet, et al. (2004). "Combined deficiency in IkappaBalpha and IkappaBepsilon reveals a critical window of NF-kappaB activity in natural killer cell differentiation." Blood **103**(12): 4573-80.

- Saulquin, X., L. N. Gastinel, et al. (2003). "Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j)." J Exp Med **197**(7): 933-8.
- Scharton, T. M. and P. Scott (1993). "Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice." J Exp Med **178**(2): 567-77.
- Schumm, M., W. Gunther, et al. (1994). "Prevention of graft-versus-host disease in DLA-haplotype mismatched dogs and hemopoietic engraftment of CD6-depleted marrow with and without cG-CSF treatment after transplantation." Tissue Antigens **43**(3): 170-8.
- Sconocchia, G., K. Keyvanfar, et al. (2005). "Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte." Leukemia **19**(1): 69-76.
- Shah, P. D., S. M. Gilbertson, et al. (1985). "Dendritic cells that have interacted with antigen are targets for natural killer cells." J Exp Med **162**(2): 625-36.
- Sharp, L. L., D. A. Schwarz, et al. (1997). "The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment." Immunity **7**(5): 609-18.
- Shi, F. D., H. B. Wang, et al. (2000). "Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity." Nat Immunol **1**(3): 245-51.
- Shi, L., C. M. Kam, et al. (1992). "Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions." J Exp Med **176**(6): 1521-9.
- Shlomchik, W. D., M. S. Couzens, et al. (1999). "Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells." Science **285**(5426): 412-5.
- Sivori, S., S. Parolini, et al. (2000). "2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation." Eur.J.Immunol. **30**(3): 787-793.
- Sivori, S., S. Parolini, et al. (2000). "Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines." J Neuroimmunol **107**(2): 220-5.
- Sivori, S., D. Pende, et al. (1999). "NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells." Eur.J.Immunol. **29**(5): 1656-1666.
- Smyth, M. J., D. I. Godfrey, et al. (2001). "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy." Nat Immunol **2**(4): 293-9.
- Smyth, M. J., K. Takeda, et al. (2003). "Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy." Immunity **18**(1): 1-6.
- Soiffer, R. J., D. Fairclough, et al. (1997). "CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission." Blood **89**(8): 3039-47.
- Soiffer, R. J. and J. Ritz (1993). "Selective T cell depletion of donor allogeneic marrow with anti-CD6 monoclonal antibody: rationale and results." Bone Marrow Transplant **12 Suppl 3**: S7-10.

- Spierings, E. and E. Goulmy (2005). "Expanding the immunotherapeutic potential of minor histocompatibility antigens." J Clin Invest **115**(12): 3397-400.
- Stark, S. and C. Watzl (2006). "2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells." Int Immunol **18**(2): 241-7.
- Stewart, C. A., F. Laugier-Anfossi, et al. (2005). "Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13224-9.
- Sugawara, T., T. Moriguchi, et al. (1998). "Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes." Immunity **9**(4): 565-74.
- Sutherland, C. L., N. J. Chalupny, et al. (2001). "The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions." Immunol Rev **181**: 185-92.
- Sutherland, C. L., N. J. Chalupny, et al. (2002). "UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells." J Immunol **168**(2): 671-9.
- Swack, J. A., J. W. Mier, et al. (1991). "Biosynthesis and post-translational modification of CD6, a T cell signal-transducing molecule." J Biol Chem **266**(11): 7137-43.
- Tieng, V., C. Le Bouguenec, et al. (2002). "Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2977-82.
- Trapani, J. A. (2001). "Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases." Genome Biol **2**(12): REVIEWS3014.
- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." Nat Rev Immunol **2**(10): 735-47.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol **47**: 187-376.
- Trotta, R., K. Fettucciari, et al. (2000). "Differential role of p38 and c-Jun N-terminal kinase 1 mitogen-activated protein kinases in NK cell cytotoxicity." J Immunol **165**(4): 1782-9.
- Trotta, R., P. Kanakaraj, et al. (1996). "Fc gamma R-dependent mitogen-activated protein kinase activation in leukocytes: a common signal transduction event necessary for expression of TNF-alpha and early activation genes." J Exp Med **184**(3): 1027-35.
- Uhrberg, M. (2005). "The KIR gene family: life in the fast lane of evolution." Eur J Immunol **35**(1): 10-5.
- Uhrberg, M., P. Parham, et al. (2002). "Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes." Immunogenetics **54**(4): 221-9.
- Uhrberg, M., N. M. Valiante, et al. (1997). "Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes." Immunity **7**(6): 753-63.
- Ullbrecht, M., B. Rehberger, et al. (1994). "HLA-G: expression in human keratinocytes in vitro and in human skin in vivo." Eur J Immunol **24**(1): 176-80.

- Unanue, E. R. (1997). "Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response." Immunol Rev **158**: 11-25.
- Upshaw, J. L., L. N. Arneson, et al. (2006). "NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells." Nat Immunol **7**(5): 524-32.
- Urosevic, M., J. Willers, et al. (2002). "HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas." Blood **99**(2): 609-17.
- Vales-Gomez, M., R. A. Erskine, et al. (2001). "The role of zinc in the binding of killer cell Ig-like receptors to class I MHC proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1734-9.
- Valiante, N. M., M. Uhrberg, et al. (1997). "Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors." Immunity **7**(6): 739-51.
- Valiante, N. M., M. Uhrberg, et al. (1997). "Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors." Immunity **7**(6): 739-751.
- Vankayalapati, R., A. Garg, et al. (2005). "Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium." J Immunol **175**(7): 4611-7.
- Velardi, A., L. Ruggeri, et al. (2002). "NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation." Trends Immunol **23**(9): 438-44.
- Vieillard, V., J. L. Strominger, et al. (2005). "NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 10981-6.
- Vitale, M., M. Della Chiesa, et al. (2004). "The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells." Eur J Immunol **34**(6): 1715-22.
- Vivier, E., J. A. Nunes, et al. (2004). "Natural killer cell signaling pathways." Science **306**(5701): 1517-9.
- von Strandmann, E. P., V. R. Simhadri, et al. (2006). "Tumor Cell-Derived HLA-B-Associated Transkript 3 (BAT3) Is a Ligand for NKp30 and Activates NK Cells." ASH Annual Meeting Abstracts **108**(11): 643-.
- Voss, S. D., J. Daley, et al. (1998). "Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells." J Immunol **160**(4): 1618-26.
- Vujanovic, N. L., S. Nagashima, et al. (1996). "Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells." J Immunol **157**(3): 1117-26.
- Vyas, Y. M., H. Maniar, et al. (2002). "Cutting edge: differential segregation of the SRC homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 within the early NK cell immune synapse distinguishes noncytolytic from cytolytic interactions." J Immunol **168**(7): 3150-4.

- Wagner, S. N., V. Rebmann, et al. (2000). "Expression analysis of classic and non-classic HLA molecules before interferon alfa-2b treatment of melanoma." Lancet **356**(9225): 220-1.
- Wagtmann, N., S. Rajagopalan, et al. (1995). "Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer." Immunity **3**(6): 801-9.
- Wang, W., L. R. Meadows, et al. (1995). "Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein." Science **269**(5230): 1588-90.
- Warren, H. S., A. L. Jones, et al. (2005). "Evidence that the cellular ligand for the human NK cell activation receptor Nkp30 is not a heparan sulfate glycosaminoglycan." J Immunol **175**(1): 207-12.
- Wei, S., A. M. Gamero, et al. (1998). "Control of lytic function by mitogen-activated protein kinase/extracellular regulatory kinase 2 (ERK2) in a human natural killer cell line: identification of perforin and granzyme B mobilization by functional ERK2." J Exp Med **187**(11): 1753-65.
- Westgaard, I. H., S. F. Berg, et al. (2004). "Rat Nkp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with FcepsilonRIgamma and CD3zeta." J Leukoc Biol **76**(6): 1200-6.
- Yelavarthi, K. K., J. L. Fishback, et al. (1991). "Analysis of HLA-G mRNA in human placental and extraplacental membrane cells by in situ hybridization." J Immunol **146**(8): 2847-54.
- Yokoyama, W. M. and S. Kim (2006). "How do natural killer cells find self to achieve tolerance?" Immunity **24**(3): 249-57.
- Yokoyama, W. M. and S. Kim (2006). "Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I." Immunol Rev **214**: 143-54.
- Yokoyama, W. M., S. Kim, et al. (2004). "The dynamic life of natural killer cells." Annu Rev Immunol **22**: 405-29.
- Yu, T. K., E. G. Caudell, et al. (2000). "IL-2 activation of NK cells: involvement of MKK1/2/ERK but not p38 kinase pathway." J Immunol **164**(12): 6244-51.
- Zhang, X. G., B. Klein, et al. (1989). "Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma." Blood **74**(1): 11-3.
- Zhao, X. Y., X. J. Huang, et al. (2007). "Prognosis after unmanipulated HLA-haploidentical blood and marrow transplantation is correlated to the numbers of KIR ligands in recipients." Eur J Haematol **78**(4): 338-46.
- Zimmerman, A. W., B. Joosten, et al. (2006). "Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells." Blood **107**(8): 3212-20.

### H. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Dolores Schendel, die mir die Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Molekulare Immunologie der GSF in Großhadern ermöglicht hat und stets großes Interesse an meiner Arbeit zeigte.

Besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. Christine S. Falk, die mich im Zuge dieser Arbeit stets mit ganzer Kraft unterstützt hat. Ihr umfangreiches Wissen über NK-Zellen war für das Zustandekommen dieser Arbeit unerlässlich. Ich wünsche Christine Falk alles Gute und viel Erfolg mit ihrer neuen Arbeitsgruppe am Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen (NCT) in Heidelberg.

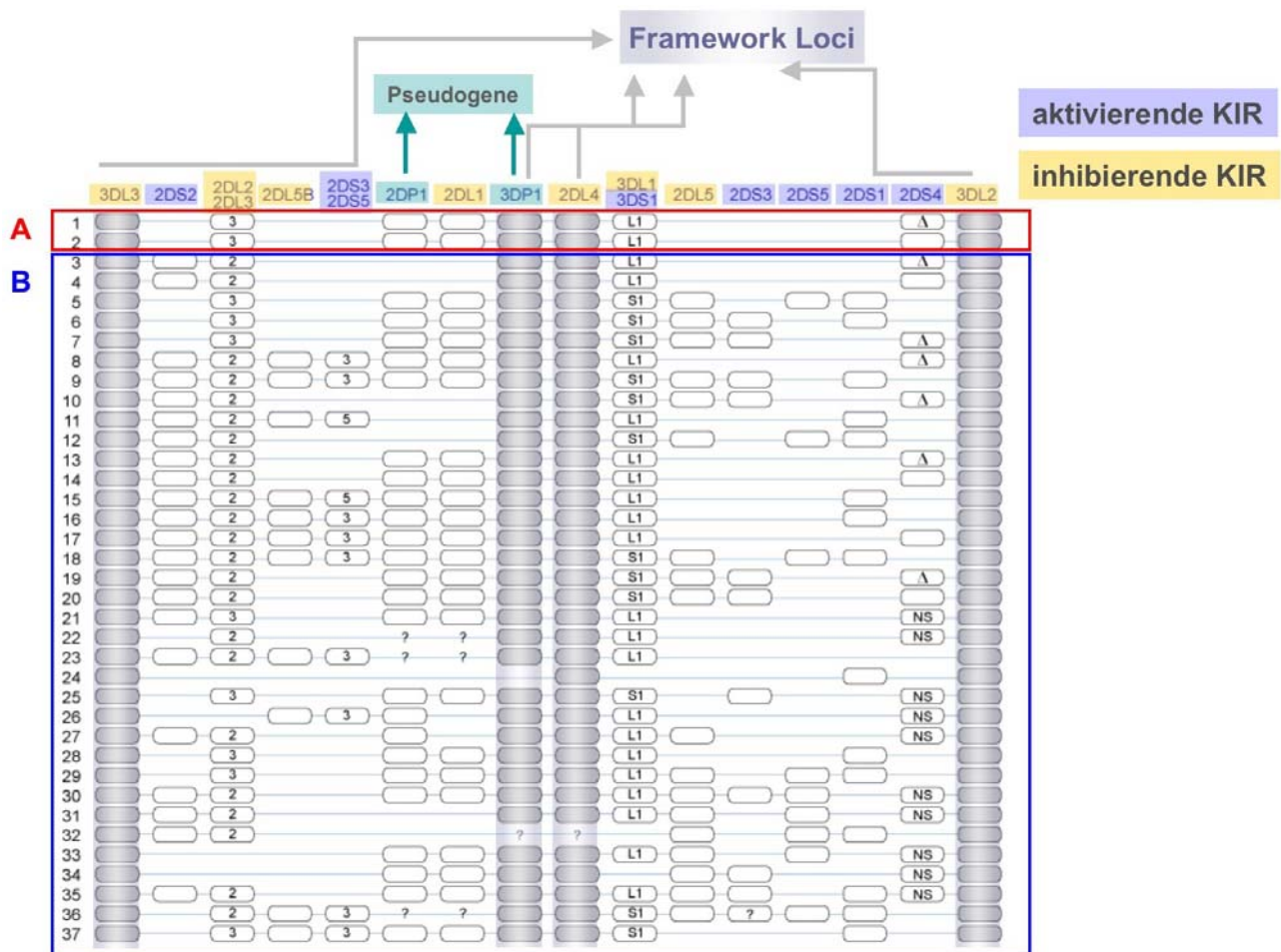
Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Hans-Jochem Kolb, dessen wichtige klinische Arbeiten in Bezug auf die haploidentische Knochenmark- und Stammzelltransplantation Grundlage für die vorliegende Arbeit waren. Besonders möchte ich ihm für die Bereitstellung des Spender- und Patientenmaterials danken.

Die gute und kollegiale Zusammenarbeit mit Frau Iris Bigalke vom GMP-Labor der GSF im Rahmen dieser Arbeit habe ich sehr genossen. Darüber hinaus werde ich mich gerne an Sandwich-Einkäufe spät abends beim Warten auf die Freigabe der Spenderpräparate erinnern. Ohne die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit mit den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hämatopoetische Stammzelltransplantation, allen voran Dusan Prevalsek, Marina Leeping, Sabine Sandner und Angela Knauerhase wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt auch Dr. Alexander Buchner.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Immunologie der GSF in Großhadern, insbesondere Silke Raffeggerst und Sylvia Donhauser, die mich auch in schweren Momenten immer wieder aufgeheitert und zum Lachen gebracht haben und Barbara Mosetter, Barbara Simm und Monika Braun für die kollegiale Zusammenarbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in all den Jahren unterstützt und an mich geglaubt haben.

I. ANHANG



**Abbildung I.1:** KIR-Haplotypen; Gene für aktivierende KIR-Rezeptoren sind hellblau unterlegt (KIR2DS2, 2DS3/5, 3DS1, 2DS3, 2DS5, 2DS1, 2DS4), Gene für inhibierende KIR-Rezeptoren gelb (KIR3DL3, 2DL2/3, 2DL5B, 2DL1, 2DL4, 3DL1, 2DL5, 3DL2), die Pseudogene 2DP3 und 3DP1 sind türkis unterlegt (nach Carrington et al).

# I. ANHANG

Abbildung I.2: Sequenz von ULBP4syn.

```

      KpnI  BamHI      HinfI
1  AATTGGGTACCGGATCCATGCGGAGAATCAGCCTGACTTCTAGCCCTGTGCGCCTGCTGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTAACCCATGGCCTAGGTACGCCCTCTTAGTCGGACTGAAGATCGGGACACGCGGACGACG
       M  R  R  I  S  L  T  S  S  P  V  R  L  L  L

      BstNI
61  TGTTCCTGCTGCTGCTGCTGATCGCCCTGGAGATCATGGTGGGAGGACACAGCCTGTGCT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ACAAAGACGACGACGACGACTAGCGGGACCTCTAGTACCACCCTCCTGTGTCGGACACGA
       F  L  L  L  L  L  I  A  L  E  I  M  V  G  G  H  S  L  C  F

      BstNI      BstNI      BstNI
121 TCAACTTCACTATCAAAAGCCTGTCCAGACCTGGACAGCCCTGGTGTGAAGCCAGGTGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGTTGAAGTGATAGTTTTCGGACAGGTCTGGACCTGTGCGGACCACACTTCGGGTCCACA
       N  F  T  I  K  S  L  S  R  P  G  Q  P  W  C  E  A  Q  V  F

      HinfI      PstI
181 TCCTGAATAAGAATCTGTTCTGTCAGTACAACAGCGACAACAACATGGTGAAACCTCTGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGGACTTATCTTAGACAAGGACGTCATGTTGTCGCTGTTGTTGTACCACCTTTGGAGACC
       L  N  K  N  L  F  L  Q  Y  N  S  D  N  N  M  V  K  P  L  G

      PflMI BstNI
241 GCCTGCTGGGGAAGAAAGTGTATGCCACCTCCACTTGGGGAGAAGTACCCAGACCCCTGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CGGACGACCCCTTCTTTACATACGGTGGAGGTGAACCCCTCTTGACTGGGTCTGGGACC
       L  L  G  K  K  V  Y  A  T  S  T  W  G  E  L  T  Q  T  L  G

      BsaI
301 GAGAAGTGGGAGAGACCTGAGGATGCTGCTGTGTGACATCAAACCCAGATCAAGACCA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCTTACCCCTCTCTGGACTCCTACGACGACACACTGTAGTTTGGGGTCTAGTTCTGGT
       E  V  G  R  D  L  R  M  L  L  C  D  I  K  P  Q  I  K  T  S

      PstI      BspMI
361 GCGATCCTTCCACTCTGCAGGTGGAGATGTTTGTGTCAGCGGAAGCCGAACGGTGCACTG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CGCTAGGAAGGTGAGACGTCCACCTCTACAAACAGTCGCGCTTCGGCTTGCCACGTGAC
       D  P  S  T  L  Q  V  E  M  F  C  Q  R  E  A  E  R  C  T  G

      BstNI
421 GAGCCTCCTGGCAGTTTCGCCACCAATGGAGAGAAATCCCTGCTGTTTGACGCCATGAACA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCGGAGGACCGTCAAGCGGTGGTTACCTCTCTTTAGGACGACAACTGCGGTACTTGT
       A  S  W  Q  F  A  T  N  G  E  K  S  L  L  F  D  A  M  N  M

      BstNI
481 TGACCTGGACCGTGATTAATCATGAAGCCAGCAAGATCAAGGAGACATGGAAGAAAGACA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ACTGGACCTGGCACTAATTAGTACTTCGGTCGTTCTAGTTCCTCTGTACCTTCTTCTGT
       T  W  T  V  I  N  H  E  A  S  K  I  K  E  T  W  K  K  D  R

      EcoRI
541 GAGGGCTGGAAGATATTTAGGAAGCTGAGCAAGGGAGACTGCGATCACTGGCTGAGGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCCCACCTTTTCATAAAGTCTTCGACTCGTTCCTCTGACGCTAGTGACCGACTCCC
       G  L  E  K  Y  F  R  K  L  S  K  G  D  C  D  H  W  L  R  E

      BstNI      NheI      EcoRV
601 AATTCCTGGGGCACTGGGAGGCCATGCCAGAACCTACAGTGAGCCAGTGAATGCTAGCG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTAAGGACCCCGTGACCCTCCGGTACGGTCTTGATGTCACTCGGGTCACTTACGATCGC
       F  L  G  H  W  E  A  M  P  E  P  T  V  S  P  V  N  A  S  D

      BstXI      BstNI
661 ATATCCACTGGTCTAGCTCTAGCCTGCCAGATAGATGGATCATCCTGGGGCCTTCATCC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TATAGGTGACCAGATCGAGATCGGACGGTCTATCTACCTAGTAGGACCCCGGAAGTAGG
       I  H  W  S  S  S  S  L  P  D  R  W  I  I  L  G  A  F  I  L

      BstNI
721 TGCTGGTGTGATGGGAATTGTGCTGATCTGTGTGTTGGTGGCAGAATGGCGAGTGGCAGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ACGACCACGACTACCCCTTAACACGACTAGACACACACCACCGTCTTACCGCTCACCGTCC
       L  V  L  M  G  I  V  L  I  C  V  W  W  Q  N  G  E  W  Q  A

      XhoI      HinfI      SacI
781 CTGGACTGTGGCCCTGAGGACATCTTGACTCGAGCGAGCTCCAGCTT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GACCTGACACCGGGACTCCTGTAGAAGTCTGCTCGAGGTCGAA
       G  L  W  P  L  R  T  S  *

```



## I. ANHANG

**Tabelle I.3:** FACS-Kombinationen für die phänotypische Untersuchung der Spenderpräparate und Rekonstitutionsanalysen.

	FL1	FL2	FL3	FL4
I	CD 19	IgG2a	-	-
II	CD44	-	-	-
III	-	CD6	-	-
IV	-	-	CD3	-
V	CD44	CD6	-	CD4
VI	CD44	CD6	CD3	CD4
1	CD3	CD8	2B4	CD4
2	CD3	CD56	γδ TCR	CD4
3	CD16	CD6	CD3	CD56
4	CD16	CD94	CD3	CD56
5	CD16	NKG2A	CD3	CD56
6	CD16	NKG2D	CD3	CD56
7	CD16	CD161	CD3	CD56
8	CD16	LAIR-1	CD3	CD56
9	CD16	p58.1	CD3	CD56
10	CD16	p58.2	CD3	CD56
11	CD16	p70	CD3	CD56
12	CD16	p50.3	CD3	CD56
13	CD16	NKp30	CD3	CD56
14	CD16	NKp44	CD3	CD56
15	CD16	NKp46	CD3	CD56
16	CD34	CD3	2B4	CD133

Die Ansätze I – VI dienten der Kompensation am FACS-Calibur.

Die nachfolgende Tabelle I.4 zeigt die HLA-C-Einteilung in Bezug auf die oben genannten Gruppe I – IV und den KIR-Genotyp der 74 untersuchten Spender/Patienten-Kombinationen, zusammen mit der zugrunde liegenden Erkrankung des Patienten. Weiterhin sind die 2DS4-Allele des jeweiligen Spenders und Empfängers gezeigt, da die Allele KIR2DS4\*003/004/006 sogenannte Null-Allele darstellen, durch die es zu keiner Expression des aktivierenden KIR2DS4-d.h. KIR2DS4 wird exprimiert. Bei den in Tabelle I.4 angeführten Nummern 1P/1D-34P/D (P für Patient und D für Spender) konnten im Zuge dieser Arbeit phänotypische Untersuchungen (siehe oben) durchgeführt werden, bei den Nummern X1P/D – X44P/D lagen nur DNS-Proben für die Typisierungen vor. Bei zwei Kombinationen (52 und 58, n.T. in Tabelle T2.5) konnte aufgrund der schlechten Qualität der DNS auch nach mehreren Wiederholungen keine eindeutige Bestimmung der KIR-Haplotypen erfolgen. Im Fall des Patienten/Empfängers 8P (Nummer 28) konnte keine Aussage über das KIR2DS4-Allel getroffen werden.

# I. ANHANG

**Tabelle I.4:** HLA-C-Einteilung der Spender-Patientenkombinationen und KIR-Haplotypen der Spender und Patienten.

	Nummer	Erkrankung	HLA-C-Kombination (Patient/Spender)		2DS4	KIR-Haplotyp
1	1P	AML	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	A/B
	1D			C2/C2	003/006	A/A
2	X1P	NHL	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	A/B
	X1D			C1/C1	003/006	A/A
3	X2P	AML	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	A/A
	X2D			C2/C2	004/004	A/B
4	X3P	NHL	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	A/B
	X3D			C2/C2	001/003/006	A/A
5	X4P	AML	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	A/A
	X4D			C1/C1	003/004/006	A/A
6	14P	ALL	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	A/B
	14D			C1/C1	no 2DS4	B/B
7	17P	AML	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	A/B
	17D			C2/C2	003/006	A/A
8	21P	AML	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	A/A
	21D			C1/C1	001/003/006	A/A
9	16P	AML	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	B/B
	16D			C2/C2	001/003/006	A/B
10	27P	AML	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	A/B
	27D			C1/C1	001/003/006	A/A
11	26P	AML	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	A/B
	26D			C1/C1	003/006	A/B
12	X44P	AML	P. hetero. - D. homoz.	C1/C2	003/006	B/B
	X44D			C2/C2	003/006	A/A
13	28P	ALL (Ph+)	P. homoz. - D. heteroz.	C1/C1	003/006	B/B
	28D			C1/C2	003/006	A/B
14	9P	NK-Zell	P. homoz. - D. heteroz.	C1/C1	003/006	A/B
	9D			C1/C2	001	A/B
15	13P	NHL	P. homoz. - D. heteroz.	C1/C1	003/006	A/B
	13D			C1/C2	003/006	A/B
16	18P	ALL	P. homoz. - D. heteroz.	C2/C2	001/003/006	A/B
	18D			C1/C2	003/006	B/B
17	X5P	SAA	P. homoz. - D. heteroz.	C1/C1	003/006	A/B
	X5D			C1/C2	001/003/006	A/B
18	X6P	NHL	P. homoz. - D. heteroz.	C1/C1	003/006	A/A
	X6D			C1/C2	001/003/006	A/A
19	3P	AML	P. homoz. - D. heteroz.	C2/C2	003/004/006	A/A
	3D			C1/C2	003/006	A/A
20	X7P	ALL	P. homoz. - D. heteroz.	C2/C2	003/006	A/B
	X7D			C1/C2	003/006	A/B
21	X8P	AML	P. homoz. - D. heteroz.	C2/C2	001/003/006	A/A
	X8D			C1/C2	003/006	A/A
22	X9P	NHL	P. homoz. - D. heteroz.	C2/C2	001/003/006	A/B
	X9D			C1/C2	001/003/006	A/B
23	X10P	NHL	P. homoz. - D. heteroz.	C1/C1	001/003/006	B/B
	X10D			C1/C2	001/001	A/B
24	X11P	MDS	P. homoz. - D. heteroz.	C1/C1	003/006	A/A
	X11D			C1/C2	001/003/006	A/A

# I. ANHANG

25	31P	NHL	P. homoz. - D. heteroz.	C1/C1	003/006	A/A
	31D			C1/C2	003/006	A/B
26	X12P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/001	B/B
	X12D			C1/C1	001/003/006	A/B
27	2P	ALL	P. homoz. D. homoz.	C2/C2	no2DS4	B/B
	2D			C2/C2	003/006	A/B
28	8P	CLL	P. homoz. D. homoz.	C2/C2	??	A/B
	8D			C2/C2	003/006	A/B
29	X13P	NHL	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	003/006	A/B
	X13D			C1/C1	003/006	A/B
30	X14P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/A
	X14D			C1/C1	003/006	A/A
31	X15P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	003/006	A/B
	X15D			C1/C1	003/006	B/B
32	X16P	NHL	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/A
	X16D			C1/C1	001/003/006	A/A
33	12P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	003/006	A/B
	12D			C1/C1	003/006	A/A
34	X17P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	004/004	A/B
	X17D			C1/C1	004/004	A/B
35	X18P	ALL	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	B/B
	X18D			C1/C1	001/001	A/B
36	X19P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/A
	X19D			C1/C1	001/003/006	A/B
37	10P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/001	A/A
	10D			C1/C1	003/006	A/A
38	X20P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	003/004/006	B/B
	X20D			C1/C1	003/004/006	A/B
39	X21P	ALL	P. homoz. D. homoz.	C2/C2	001/003/006	A/A
	X21D			C2/C2	001/003/006	A/A
40	X22P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/B
	X22D			C1/C1	002/004	A/B
41	15P	ALL	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/001	A/B
	15D			C1/C1	003/006	A/B
42	X23P	ALL	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/B
	X23D			C1/C1	001/003/006	A/B
43	X24P	ALL	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/B
	X24D			C1/C1	001/003/006	A/B
44	X25P	ALL	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/A
	X25D			C1/C1	001/003/006	A/B
45	X26P	ALL	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/B
	X26D			C1/C1	001/003/006	A/B
46	X27P	NHL	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/B
	X27D			C1/C1	001/003/006	A/B
47	X28P	NHL	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/B
	X28D			C1/C1	001/003/006	A/A
48	X29P	CML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	003/006	A/B
	X29D			C1/C1	001/003/006	A/A
49	X30P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/A
	X30D			C1/C1	001/003/006	B/B
50	X31P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/A
	X31D			C1/C1	001/003/006	A/B

# I. ANHANG

	Nummer	Erkrankung	HLA-C-Kombination (Patient/Spender)		2DS4	KIR-Haplotyp
51	20P	T-ALL (refr.)	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	003/006	A/B
	20D			C1/C1	003/006	A/B
52	22P	s-AML (ref.)	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	n.T.	n.T.
	22D			C1/C1	n.T.	n.T.
53	29P	s-AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	003/006	A/B
	29D			C1/C1	003/006	A/B
54	33P	s-AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	001/003/006	A/A
	33D			C1/C1	001/001	A/B
55	34P	CML	P. homoz. D. homoz.	C2/C2	001/002/003/004	A/A
	34D			C2/C2	001/001	A/B
56	32P	MPS	P. homoz. D. homoz.	C2/C2	003/006	A/B
	32D			C2/C2	003/006	A/B
57	X46P	AML	P. homoz. D. homoz.	C1/C1	003/006	A/A
	X46D			C1/C1	003/006	A/B
58	19P	T-ALL	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	n.T	n.T
	19D			C1/C2	n.T.	n.T.
59	7P	AML	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/B
	7D			C1/C2	001	A/B
60	X32P	ALL	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/A
	X32D			C1/C2	003/006	A/A
61	X33P	AML	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/B
	X33D			C1/C2	003/006	B/B
62	11P	AML	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	001/003/006	B/B
	11D			C1/C2	003/006	A/A
63	X34P	NHL	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	001	A/B
	X34D			C1/C2	001	A/B
64	X35P	AML	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/A
	X35D			C1/C2	001/003/006	A/B
65	X36P	ALL	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/A
	X36D			C1/C2	001/003/006	A/A
66	X37P	ALL	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/B
	X37D			C1/C2	001/003/006	A/B
67	23P	AML	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	001	A/B
	23D			C1/C2	001/003/006	A/B
68	5P	NHL	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/B
	5D			C1/C2	003/006	A/B
69	6P	ALL	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	001/003/006	A/B
	6D			C1/C2	001/003/006	A/B
70	X38P	MHD	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/B
	X38D			C1/C2	003/006	A/B
71	X39P	AML	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	001/003/006	A/A
	X39D			C1/C2	003/006	A/A
72	X41P	ALL	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/A
	X41D			C1/C2	003/006	A/B
73	X42P	Pro-B-ALL	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/B
	X42D			C1/C2	no2DS4	B/B
74	X43P	s-AML	P. hetero. - D. hetero.	C1/C2	003/006	A/A
	X43D			C1/C2	001/003/006	A/B

**Tabelle I.5:** Verwendete DNS-Proben der Spender und Patienten.

Spender		Patient	
1D	X9D	1P	X9P
2D	X10D	2P	X10P
3D	X11D	3P	X11P
5D	X12D	5P	X12P
6D	X13D	6P	X13P
7D	X14D	7P	X14P
8D	X15D	8P	X15P
9D	X16D	9P	X16P
10D	X17D	10P	X17P
11D	X18D	11P	X18P
12D	X19D	12P	X19P
13D	X20D	13P	X20P
14D	X21D	14P	X21P
15D	X22D	15P	X22P
16D	X23D	16P	X23P
17D	X24D	17P	X24P
18D	X25D	18P	X25P
19D	X26D	19P	X26P
20D	X27D	20P	X27P
21D	X28D	21P	X28P
22D	X29D	22P	X29P
23D	X30D	23P	X30P
26D	X31D	26P	X31P
27D	X32D	27P	X32P
28D	X33D	28P	X33P
29D	X34D	29P	X34P
31D	X35D	31P	X35P
32D	X36D	32P	X36P
33D	X37D	33P	X37P
34D	X38D	34P	X28P
X1D	X39D	X1P	X39P
X2D	X40D	X2P	X40P
X3D	X41D	X3P	X41P
X4D	X42D	X4P	X42P
X5D	X43D	X5P	X43P
X6D	X44D	X6P	X44P
X7D	X45D	X7P	X45P
X8D	X46D	X8P	X46P

# LEBENS LAUF

---

## Dominik ter Meer

### Persönliche Daten

Geburtsdatum	19.09.1973
Geburtsort	München
Familienstand	ledig

### Ausbildung

04/2004 – 05/2007	Promotion am Insitut für Molekulare Immunologie, GSF, Großhadern Thema: “Die Rolle humaner NK-Zellen für die Eradikation von Leukämien in der HLA-haploidentischen Knochenmark- und Stammzelltransplantation“
11/2003 – 03/2004	Freiberuflicher Übersetzer technischer Texte
01/2002 - 10/2003	Patentanwaltskandidat bei Patentanwälten ter Meer Steinmeister&Partner
10/1996 - 05/2001	Studium der Biochemie an der Universität Regensburg Abschluss: Diplom-Biochemiker univ. Diplomarbeit: DevT, ein an der Heterozystendifferenzierung des Cyanobakteriums <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 beteiligter Transkriptionsfaktor?
10/1995 - 08/1996	Studium Feinwerk- und Mikrotechnik an der FH München,
10/1994 - 01/1995	Studium an der Université des Sciences Humaines Strasbourg, Frankreich, Abschluss: Diplome d'Etudes Françaises (Deuxième Degré)
07/1993 - 07/1994	Grundwehrdienst, Stabsstaffel/ABC/SeSol FlaRaGrp33 Erding, Stab JaboG49/Fluglehrgruppe FFB Stabsdienstsoldat
07/1993	Abitur, Carl-Spitzweg-Gymnasium, Germering

## LEBENS LAUF

---

### Praktika

08/2001 - 11/2001	Geneart GmbH, Regensburg, Gensynthese
05/2000 - 08/2000	Entelechon GmbH, Regensburg, Gensynthese
08/1997 - 09/1997	Dionex Softron GmbH (Gynkotheke)
02/1995 - 03/1995	Agfa-Gevaert AG, Ausbildungswerkstatt,

### Vorträge und Poster

#### Posterpräsentation

#### **Abstract for 9<sup>th</sup> Meeting of The Society for Natural Immunity**

Poipu Beach, Kauai, November 4-8, 2005

Phenotype and functionality of transplanted NK cell populations in haploidentical bone marrow and stem cell transplantation. Dominik ter Meer<sup>1</sup>, Iris Bigalke<sup>1</sup>, Barbara Mosetter<sup>1</sup>, Barbara Simm<sup>1</sup>, Monika Braun<sup>1</sup>, Dusan Prevorsek<sup>2</sup>, Hans-Jochem Kolb<sup>2</sup> and Christine S. Falk<sup>1</sup>. 1 Institute for Molecular Immunology, GSF Research Center for Environment and Health, Munich, Germany; 2 III. Medical Clinic Großhadern, LMU Munich, Germany.

#### Vortrag

#### **Multiplex Protein Array User Meeting, 06.July 2005, Basel**

Multiplex-Technology and signal transduction: the detection and quantification of phosphorylated kinases - a safe and fast alternative to classical Western Blot analyses?